

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENDÓFITOS Y  
MICORRÍZICOS PRESENTES EN LA RELACIÓN SIMBIÓTICA DE LA  
ESPECIE *Caucaea pichincha* (ORCHIDACEAE) CON SU RESPECTIVO  
HOSPEDERO.**

**AUTORAS:**

**MARGARITA DE LOS ÁNGELES CAZAR IZA**

**DANIELA BELÉN PÉREZ REYES**

**TUTOR:**

**MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS**

**Quito, julio del 2019**

### Cesión de derechos del autor

Nosotras, Margarita de los Ángeles Cazar Iza, con documento de identificación N° 1726726878, y Daniela Belén Pérez Reyes con documento de identificación N° 1718330754, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado “Identificación molecular de hongos endófitos y micorrízicos presentes en la relación simbiótica de la especie *Caucaea pichincae* (*Orchidaceae*) con su respectivo hospedero”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Nombre: Margarita de los Ángeles Cazar Iza

Cédula: 1726726878

Fecha: julio 2019

Nombre: Daniela Belén Pérez Reyes


Cédula: 1718330754

Fecha: julio 2019

### Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Identificación molecular de hongos endófitos y micorrízicos presentes en la relación simbiótica de la especie *Caucaea pichincae* (*Orchidaceae*) con su respectivo hospedero”, realizado por Margarita de los Ángeles Cazar Iza y Daniela Belén Pérez Reyes, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, julio de 2019

(f).....  


Marco Fernando Cerna Cevallos

CI. 0501872071

## **Dedicatoria**

A Dios por ser parte de esta travesía con su sabiduría y fortaleza logré culminar el  
sueño de ser profesional.

A mis abuelitos Blanquita y Manuelito Iza que siempre estuvieron con sus consejos  
oportunos brindándome seguridad en los momentos difíciles.

A mis padres en especial a mi madre Nancy por darme su apoyo incondicional,  
inculcándome a ser una mejor persona y sobre todo por anhelar lo mejor para mi  
vida.

A mis hermanos Fernando, Ariel por todos los momentos gratos compartidos y sus  
frases motivadoras permitiéndome aumentar mi fé.

Margarita Cazar

Al creador de todas las cosas, al que me ha dado fortaleza para continuar cada día.

A mis padres Bélgica y Jorge por haberme forjado como la persona que soy,  
impulsándome siempre a cumplir mis sueños.

A mis hermanas Fernanda, Priscila y a mi hermano Jorge que siempre han estado  
dispuestos a ayudarme.

A mis sobrinos Brandon, Mateo y Brenda que por medio de sus alegrías me han  
motivado a seguir adelante.

A David por brindarme su amor, apoyo incondicional y por siempre anhelar lo mejor  
en mi vida

Daniela Pérez

## **Agradecimientos**

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana, a toda la carrera de Biotecnología, a nuestros docentes por compartir sus enseñanzas y experiencias durante nuestro periodo académico permitiéndonos crecer cómo buenas profesionales.

A nuestro Tutor Marco Cerna Ph.D por darnos la oportunidad de integrar el grupo de investigación NUNKUI WAKAN, brindándonos su conocimiento para el desarrollo del presente proyecto de investigación y su motivación continua.

Al Ing. Alexander Hirtz por la donación de muestras y trabajo en campo, al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por hacer posible la ejecución, financiamiento de nuestro proyecto y a los ingenieros Elizabeth Yugsi, Byron Fuertes que forman parte del personal de los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la carrera Ing. en Biotecnología por la colaboración oportuna.

A nuestros compañeros y compañeras por los momentos compartidos durante toda la carrera y por su amistad incondicional.

## Índice

Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	3
1. Marco conceptual .....	3
1.1 Familia Orchidaceae.....	3
1.2 Género <i>Caucaea</i> .....	4
1.2.1 Clasificación taxonómica del género <i>Caucaea</i> .....	5
1.2.2 Descripción botánica y morfológica de <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan. ....	5
1.3 Relación simbiótica.....	7
1.4 Hongos endófitos.....	8
1.4.1 Clasificación de los hongos endófitos:.....	9
1.5 Micorrizas/Hongos micorrízicos .....	10
1.5.1 Micorrizas de orquídeas .....	10
1.5.2 Clasificación de hongos micorrízicos .....	11
1.6 Técnicas moleculares para la identificación.....	12
1.6.1 Extracción de ADN .....	12
1.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	12
1.6.3 Secuenciación Sanger.....	14
Capítulo 2.....	16
2. Metodología.....	16
2.1 Área de estudio de la especie <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan. ....	16
2.2 Recolección de las muestras del género <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan. con su respectivo hospedero.....	16
2.3 Aislamiento de hongos provenientes de tallos y raíz .....	18
2.3.1 Preparación del medio de cultivo PDA.....	18
2.3.2 Protocolo de desinfección de las muestras .....	18
2.3.3 Siembra de las muestras y aislamiento de hongos .....	19

2.4	Identificación morfológica de los subcultivos aislados de tallo y raíz.....	19
2.5	Identificación molecular.....	20
2.5.1	Extracción de ADN del material fúngico.....	20
2.5.2	Amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear.....	21
2.5.3	Secuenciación.....	22
2.5.4	Análisis de las secuencias .....	23
Capítulo 3.....		24
3.	Resultados y discusión .....	24
3.1.	Recolección de las muestras del género <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan con su respectivo hospedero.....	24
3.2.	Aislamiento de hongos de tallo y raíz .....	25
3.3.	Identificación morfológica de los hongos aislados .....	28
3.4.	Identificación molecular.....	46
3.4.1.	Amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear.....	46
3.4.2	Análisis de las secuencias .....	48
3.4.3	Análisis de la biodiversidad en los puntos de recolección.....	57
Conclusiones .....		59
Recomendaciones.....		60
Bibliografía .....		61
Anexos: .....		72

## Índice de Tablas

Tabla 1 Puntos de recolección de las muestras de la especie <i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan con sus coordenadas geográficas (UTM).....	16
Tabla 2 Listado de las muestras colectadas .....	17
Tabla 3 Preparación de la disolución para <i>PCR</i> con el <i>Kit Phire Plant Direct PCR Master Mix</i> .....	21
Tabla 4 Condiciones de temperatura para la amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear .....	22
Tabla 5 Subcultivos de los hongos endófitos aislados de las muestras de tallo .....	26
Tabla 6 Subcultivos de hongos aislados de las muestras de raíz.....	27
Tabla 7 Estructuras macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de tallos en medio PDA.....	29
Tabla 8 Estructuras macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de raíz en medio PDA.....	39
Tabla 9 Secuencia del ADN cloroplástico de la especie <i>Caucaea pichincha</i> Szlach & Kolan.....	49
Tabla 10 Secuencia del ADN cloroplástico de la especie <i>Oreopanax ecuadoriensis</i> Seem.....	50
Tabla 11 Listado de los grupos formados del árbol filogenético de las muestras de tallo.....	53
Tabla 12 Listado de los grupos formados del árbol filogenético de las muestras de raíz	56



## Índice de Figuras

Figura 1 Descripción morfológica de <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan .....	6
Figura 2 Identificación taxonómica de la especie de estudio y su hospedero.....	24
Figura 3 Resultado de la amplificación de la región <i>matK</i> , usando como muestra la hoja de la especie <i>Caucaea pichincae</i> Szlach. & Kolan. recolectada en cada punto geográfico.....	47
Figura 4 Resultados de los productos de la amplificación de la región <i>ITS</i> . .....	48
Figura 5 Árbol filogenético Neighbor-Joining a partir de las secuencias obtenidas de la región <i>matK</i> de las muestras recolectadas .....	51
Figura 6 Árbol filogenético Neighbor-Joining a partir de las secuencias obtenidas de la región <i>ITS</i> de los hongos aislados de las muestras de tallo. ....	52
Figura 7 Árbol filogenético Neighbor-Joining a partir de las secuencias obtenidas de la región <i>ITS</i> de los hongos aislados de las muestras de raíz. ....	55
Figura 8 Número de especies fúngicas identificadas en los lugares de recolección ..	58

## Índice de Anexos

Anexo 1 Recolección de las muestras de la especie <i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan, con su respectivo hospedero <i>Oreopanax ecuadoriensis</i> Seem. y su etiquetado. ....	72
Anexo 2 Proceso de desinfección de las muestras de tallo. ....	73
Anexo 3 Proceso de desinfección de las muestras de raíz. ....	74
Anexo 4 Siembra de las muestras y aislamientos de los hongos. ....	75
Anexo 5 Resultado electroforético de la extracción de ADN de los hongos aislados. ....	76
Anexo 6 Electroferograma de las secuencias obtenidas para la región <i>matK</i> y la región <i>ITS</i> .....	77
Anexo 7 Alineamiento de las secuencias obtenidas de las diez muestras recolectadas de la especie <i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan. ....	78
Anexo 8 Identificación molecular de hongos aislados de tallo utilizando los primers <i>ITS 1</i> e <i>ITS 4</i> .....	79
Anexo 9 Identificación molecular de hongos aislados de raíz utilizando los primers <i>ITS 1</i> e <i>ITS 4</i> .....	80

## Resumen

En el presente trabajo se estudiaron los hongos endófitos y micorrízicos de la especie *Caucaea pichincha*, con su respectivo hospedero en cuatro puntos de recolección distribuidos en la Provincia de Pichincha, para el estudio molecular se tomaron muestras de hojas y raíz de *C. pichincha* y un segmento del tallo del hospedero, con la cual se determinó que el hospedero corresponde a la especie *Oreopanax ecuadoriensis*, conocido como “Pumamaqui”, para el aislamiento de las especies fúngicas se establecieron cultivos en medio nutritivo PDA, este material se utilizó para extraer ADN, del cual se amplificó el segmento nuclear *ITS*. Para la identificación del hospedero y huésped se extrajo ADN de tejido foliar y se amplificó un segmento del gen cloroplástico *matK*. Las secuencias obtenidas fueron secuenciadas y usadas para la identificación de las especies, además se analizó la familiaridad de las especies mediante análisis filogenético; se identificaron 25 especies de endófitos presentes en el tallo del hospedero, del cual una especie está presente en tres de las cuatro localidades estudiadas, en relación a las muestras aisladas de la raíz del huésped se identificaron 18 especies fúngicas, de las cuales dos especies se repiten en dos localidades; las demás especies son específicas para cada sitio de recolección. En conclusión, la especie *Caucaea pichincha* establece poblaciones fúngicas en su mayoría distintas en cada sector, en muy pocas ocasiones se repiten en dos localidades.

**Palabras clave:** Endófitos, identificación molecular, micorrizas.

## Abstract

In the present work the endophytic and mycorrhizal fungi of the *Caucaea pichincha* species will be studied, with their respective host in the four collection points distributed in the Province of Pichincha, for the molecular study the leaves and the root of *C. pichincha* were taken and *Oreopanax ecuadoriensis*, known as "Pumamaqui", for the isolation of the fungal species were established crops in nutritious medium PDA, this material was used to extract DNA, from which the *ITS* nuclear segment was amplified. For the identification of the host and guest, DNA was extracted from leaf tissue and a segment of the chloroplastic *matK* gene was amplified. The obtained sequences were sequenced and used for the identification of the species, in addition the familiarity of the species was analyzed by phylogenetic analysis; We identified 25 species of endophytes present in the stem of the host, of which one species is present in three of the four localities studied, in relation to the samples isolated from the guest root, 18 fungal species were identified, of which two species were repeat in two locations; the other species are specific to each collection site. In conclusion, the species *Caucaea pichincha* establishes fungal populations mostly different in each sector, very rarely are repeated in locations.

**Keywords:** Endophytes, molecular identification, mycorrhizae.

## Introducción

La familia vegetal Orchidaceae ha desarrollado numerosas estrategias de colonización en ecosistemas terrestres con el fin de hacer frente a los diversos retos bióticos y abióticos (Camarena-Gutierrez, 2012). El potencial endófito de los hongos en las orquídeas es un ejemplo de ello, considerando que estos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Cando y Cárdenas, 2017). Las micorrizas son una forma intrincada de asociación de las raíces con algunos grupos de hongos, siendo el sistema de absorción de nutrientes en la mayoría de orquídeas presentes en la naturaleza. La estrecha relación que existe entre el hospedero y huésped se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos (Sánchez-Fernández et al., 2013).

Jiang, Lee, Cubeta y Chen (2015), mencionan que los hongos aislados de raíces de orquídeas aumentaron la germinación de las semillas entre un 44 a 91 % promoviendo el crecimiento protocormo de las fases III a VI del cultivo *in vitro* en comparación con otros tratamientos en ausencia de hongos micorrízicos. Salazar (2017), señala que la relación entre las orquídeas y hongos endófitos es indispensable para su desarrollo, esta relación puede ser específica o no, permitiendo relacionar la distribución geográfica de la orquídea por los hongos endófitos presentes en el hospedero.

En el Ecuador, existen investigaciones enfocadas al estudio de la relación simbiótica entre hongos micorrízicos y las raíces de las especies de la familia Orchidaceae, Crespo y Ortega (2012), estudian el aislamiento de micorrizas para evaluar su actividad simbiótica en semillas de orquídeas. Moína-Quimí, Oviedo-Anchundia, Nieto-Barcelona, Herrera-Samaniego y Barcos-Arias (2018), analizan la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares y árboles del trópico húmedo ecuatoriano. Las

orquídeas buscan un medio adecuado en las ramas o tallos de diferentes árboles brindándoles estabilidad para poder desarrollarse, siendo indispensable la presencia de microorganismos fúngicos que les proporcione nutrientes debido a la carencia de endospermo en la semilla (Tupac y Alomia, 2015). Las orquídeas crean un vínculo con su hospedero, pero se desconoce si presentan especificidad para adaptarse en él, ya que las semillas de las orquídeas son transportadas por aire y agua siendo depositadas en la superficie de los diferentes árboles sin garantizar su supervivencia (Rodríguez, 2009). Los hongos endófitos y los hongos formadores de micorrizas se encuentran ligados entre sí por la relación mutualista que crea entre el huésped y hospedero, donde la orquídea se puede beneficiar del endófito por: inducción de metabolitos de defensa, secreción de fitohormonas elevando la tasa de crecimiento y movilidad de nutrientes para la orquídea (Ordoñez, 2012).

Es así que, basándose en la importancia de la interacción fúngica para la supervivencia, nutrición de la semilla y desarrollo de la orquídea, se realiza este estudio con el objetivo de identificar molecularmente los hongos endófitos y micorrízicos presentes en la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan. con su respectivo hospedero, para ello se recolectaron individuos completos de la especie en estudio en cuatro localidades distribuidas en la Provincia de Pichincha, incluyendo un segmento de su hospedero, posteriormente se aisló los hongos endófitos y micorrízicos presentes en las muestras de tallo y raíz respectivamente con el propósito de obtener subcultivos fúngicos que permitan su identificación morfológica, además se determinó la identidad de las especies de los hongos aislados mediante técnicas moleculares, identificando la familiaridad de los integrantes de las relaciones simbióticas.

## Capítulo 1

### 1. Marco conceptual

#### 1.1 Familia Orchidaceae

Las orquídeas corresponden a la familia vegetal más amplia contando con 800 géneros y alrededor de 24.000 especies distribuidas en todo el mundo, manifestando el interés científico por los diferentes agentes polinizadores, sistemas de almacenamiento de agua conocidos como pseudobulbos, su complejidad con respecto a las flores y sus relaciones simbióticas con ciertos hongos de su alrededor (Mejía, Pino y Pino–Benítez, 2008). La palabra Orquídea proviene del griego *ορχις* (orchis) cuyo significado es “testículo” que fue descrito por primera vez en el manuscrito de la obra *De causis plantarum* del filósofo griego Teofrasto del 375 a.C. describiendo así a la forma globosa de los pseudobulbos dobles representando la raíz y tallo de la orquídea (Velasco, 2010).

En el Ecuador la familia Orchidaceae equivale al 24% de la flora nativa ecuatoriana, en la naturaleza de cada diez especies silvestres cuatro son orquídeas y están distribuidas en todos los pisos altitudinales, se estima que en Ecuador anualmente se pierde 1.7 % de la superficie forestal por la recolección ilegal y uso del suelo para la agricultura, ganadería o minería por lo que afecta significativamente a las especies que habitan en estas áreas, por esta razón Ecuador establece estrategias de conservación o concientización como la propuesta “Ecuador, País de las Orquídeas” (Cerna, Cárdenas, Cruz, & Jácome, 2015; Ministerio de Turismo, 2013)

Las orquídeas son conocidas por las diferentes tipologías de sus flores que las diferencian de las demás especies vegetales y por sus interacciones con otros seres vivos como los hongos micorrízicos, hongos endófitos, árboles hospederos y agentes

polinizadores (Velasco, 2010). Por estas innovaciones a las orquídeas se las considera la familia más evolucionada, según investigaciones se identificó 474 familias de genes específicos donde demuestra que las orquídeas se diferenciaron y evolucionaron dando origen a su alta diversidad (Zhang et al., 2017).

Se conoce que en la biodiversidad de los bosque las plantas epifitas están presentes en un 30 %, predominando en la biomasa, reciclaje de nutrientes, refugio, reproducción para insectos y anfibios, como hemos mencionado la principal característica es la capacidad de crecer en otro ser vivo generando relaciones simbióticas con otros hongos de su alrededor (Henao-Díaz, Pacheco-Fernández, Argüello-Bernal y Stevenson, 2012). Por ello, las orquídeas son responsables de la mayor diversidad y abundancia biótica en los bosques (Granados, López, Hernández y Sánchez, 2004).

## **1.2 Género *Caucaea***

Las especies del género *Caucaea* crecen como plantas epifitas especialmente en bosques montanos y en bosques nubosos andinos, este género presenta 20 especies distribuidas entre Perú, Venezuela, Colombia y Ecuador, sin embargo, en este último se encuentra la mayor biodiversidad observada de esta especie (Szlachetko & Kolanowska, 2015). La familia está distribuida a partir de los 2500 m.s.n.m. exponiéndose a una mayor captación de radiación UV, provocando varios cambios en sus caracteres morfológicos o estructurales, permitiendo adaptarse y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales que dan como resultado un valor adaptativo (Chase & Palmer, 1988). En muchas ocasiones, es sujeto de debate frente a la escasa información científica, de igual manera, las orquídeas del género *Oncidium* han sido motivo de discusión por más de 175 años, sin llegar a un consenso (Stacy, 1975). Szlachetko y Kolanowska (2015), menciona que dicho debate se debe a la variación fenotípica y a la similitud superficial morfológica de la flor entre ambos géneros



promoviendo la necesidad de delimitarlos, por ello, en los estudios moleculares realizados se descubrió que existe una relación entre los representantes del género *Caucaea* y *Oncidium*, en el pasado el género *Caucaea* era reconocido como un taxón monoespecífico con 8 divisiones; sin embargo, a partir de dichos estudios los investigadores propusieron la agrupación de los dos géneros en uno, con el nombre *Caucaea* pero Dodson y Luer (2005), rechazaron dicha propuesta y realizaron investigaciones de la morfología del ginostemo confirmando así la similitud que existe en las estructuras reproductivas. Además mediante el análisis filogenética se comprobó que existente distancia entre *Caucaea* con respecto a *Oncidium* (Neubig et al., 2012).

### **1.2.1 Clasificación taxonómica del género *Caucaea***

La taxonomía del género *Caucaea* se dispone de la siguiente manera: reino Plantae, filo Tracheophyta, clase Liliopsida, orden Asparagales, familia Orchidaceae, género *Caucaea* (Roskov et al., 2019).

### **1.2.2 Descripción botánica y morfológica de *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.**

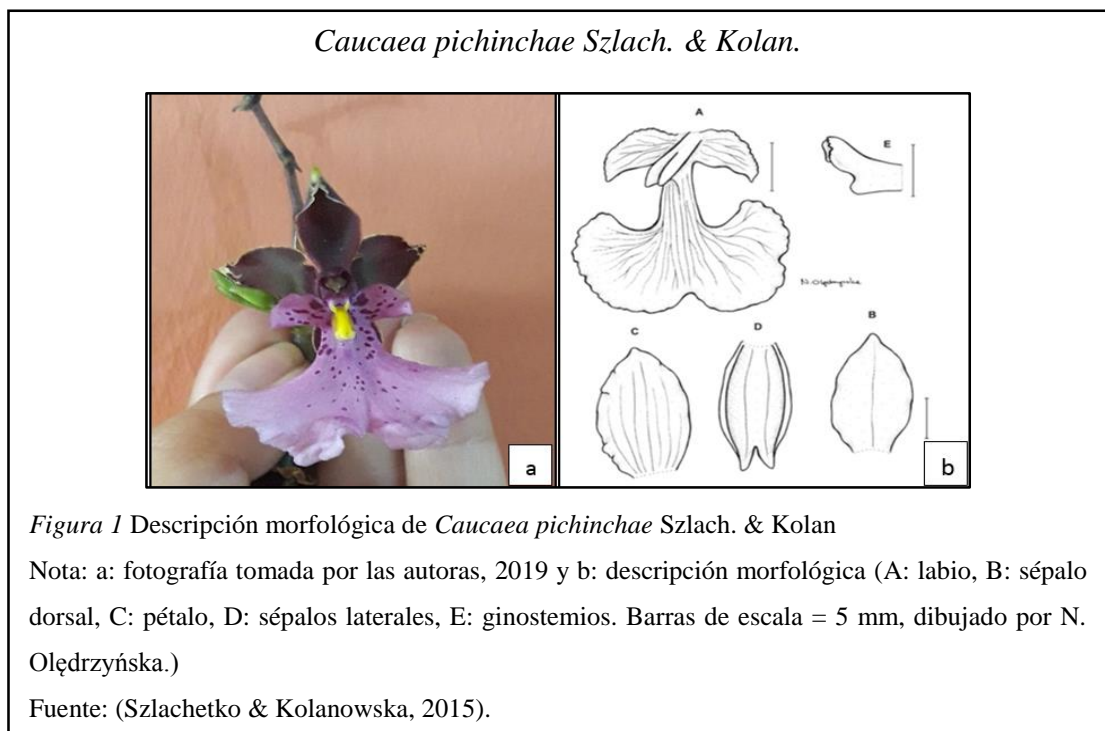
- **Descripción Botánica**

La especie *Caucaea* crece a partir de los 2500 m.s.n.m. presenta una gran similitud con la especie *C. cucullata* (Lindl.) N.H. Williams & M.W. Chase, entre las diferencias principales de la especie son: sépalo dorsal obtuso oval-elíptico vs. oblongo-lanceolado agudo; callo glabro vs. piloso en la base, en forma de dos crestas paralelas vs. uno o tres quillas (Szlachetko & Kolanowska, 2015).

- **Descripción Morfológica**

La especie en estudio consta de las siguientes partes: un pseudobulbo de 7 cm de largo, 1.8 cm de ancho cilíndrico-ovoide, bilateralmente comprimido y bifoliado; sus hojas

son lineales y lanceoladas alcanzando hasta 42 cm de largo y 2.7 cm de ancho; inflorescencia de hasta 100 cm de largo, racimosas y ramificadas con flores de color rosa con manchas moradas; bráctea floral de 3 mm de largo ovada-triangular, aguda; pedicelo y ovario de 27 mm de largo; sépalo dorsal nervado ovado-elíptico obtuso de 15 mm de largo y pétalos de 15 mm de largo, 8 mm de ancho, grueso, elíptico, obtuso, algo oblicuo con márgenes ligeramente ondulados y con 7 nervaduras; sépalos laterales que miden 15 mm de largo, 7.5 mm de ancho juntos, connados; labio 20 mm de largo y 17 mm de ancho en el lateral. Presentan un lóbulo de 20 mm de ancho delgado y trilobulado; los lóbulos laterales miden 3.5 mm de ancho con márgenes crenados, ápice subagudo; istmo prominente de 7 mm largo estrecho; y el lóbulo medio mide aproximadamente 12 mm de largo y es cordado en la base, flabelado, poco bífidos con márgenes ondulados; el callo está formado por dos crestas paralelas en forma de quilla que se extienden hasta aproximadamente 1/3 de la longitud del labio; ginostemio de 7 mm de largo apicalmente dentado. Ver Figura 1 (Szlachetko & Kolanowska, 2015).



### **1.3 Relación simbiótica**

Gracias a sus interacciones ecológicas las orquídeas han podido establecerse en ramas o copas de los árboles hospederos o forofito creando una relación simbiótica para la germinación de su semilla y desarrollo proporcionando soporte al huésped (orquídea) sin recibir daño alguno excepto el del ramaje, esta relación simbiótica es obligatoria para garantizar su supervivencia en los primeros estadios de germinación de su semilla encontrando alrededor de 4'000.000 semillas diminutas en las cápsulas presentan un tamaño aproximado de 1-2 mm de largo y 0.05-1 mm de ancho impidiendo almacenar nutrientes, estas son transportadas por el aire y agua por lo cual son depositadas en la superficie de los árboles hospederos, para dicha supervivencia necesita establecerse en un medio adecuado con ayuda de hongos micorrízicos cuya principal función es el intercambio de nutrientes promoviendo el crecimiento no fotosintéticos del protocormo y hongos endófitos del hospedero, dónde estudios han demostrado que estos hongos son organismos que viven en el tejido vegetal sin causar alguna enfermedad o daño durante su ciclo de vida, cuya característica que los diferencian de los hongos micorrízicos es que no forma pelotones al interior de las células del huésped (Ruíz, Moreno, Salgado y Olivera, 2016; Salazar, 2017; Torres-Quintero, 2012).

La presencia de micorrizas favorece la absorción, solubilidad y la disponibilidad de nutrientes como son el fósforo, zinc, potasio, hierro y calcio permitiendo a su vez la asimilación del nitrógeno, prolongando así su tiempo de vida, creando una protección contra posibles daños externos o microorganismos mediante la síntesis de metabolitos, así mismo por el proceso de colonización la comunidad de hongos micorrízicos presentes pueden variar dependiendo de las condiciones edáficas y climáticas (Barrer, 2009; León y Romero, 2017). Esta relación entre endófitos, micorrizas y orquídeas se

describe comúnmente como mutualista dónde todas las partes obtienen un beneficio (Ordoñez, 2012).

#### **1.4 Hongos endófitos**

El término endófito se deriva del griego *endon*: dentro y *phyte*: planta, fue empleado por primera vez en 1866, es utilizado para referirse a los organismos encontrados dentro de los tejidos de plantas vivas desde patógenos foliares hasta simbiontes de raíces micorrizales (Arnold, 2007).

Khiralla, Spina, Yagi, Mohamed y Laurin-Mattar (2016), están de acuerdo en que los hongos endófitos colonizan raíz, tallos u hojas de las plantas sin causar daño, estos son una herramienta biotecnológica importante ya que producen metabolitos secundarios, pero para acceder a esta fuente de moléculas bioactivas es necesario realizar investigaciones y catalogar las diferentes especies.

En investigaciones anteriores se ha descubierto que los hongos endófitos pueden favorecer a la protección de su hospedero contra patógenos, herbívoros, estrés térmico o salino y presencia de metales por tres mecanismos:

- Directos: por medio de metabolitos secundarios y enzimas
- Indirectos: estimular la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos a su planta hospedera
- Ecológicos: por un nicho ecológico, hiperparasitismo y predación (Sánchez-Fernández et al., 2013).

#### **1.4.1 Clasificación de los hongos endófitos:**

Los hongos endófitos han sido frecuentemente divididos considerando sus diferencias taxonómicas, rango del huésped, patrones de transmisión de colonización, especificidad de tejido y función ecológica, es así que los han dividido en dos grupos: endófitos clavicipitáceos (C-endófitos) y los no anticlatos o no clavicipitáceos (NC-endófitos) (Schaechter, 2011).

##### **1.4.1.1 Endófitos Clavicipitáceos**

Los endófitos clavicipitáceos o denominados clase I corresponde a la división de hongos Hypocreales y Ascomycota involucrando especies de vida libre y de relaciones simbióticas con insectos, hongos, pastos (Stone, Bacon, & White, 2000). Algunos de las especies de esta clase produce alcaloides tóxicos para los humanos y animales, el micelio de los C-endófitos crece en los espacios intercelulares de las vainas de las hojas, culmos o de los rizomas cuyos efectos en la planta huésped son disuasión de insectos, herbívoros o mamíferos, reducción de nemátodos y mejora la fisiología de las plantas huésped (Khiralla et al., 2016).

##### **1.4.1.2 Endófitos no-clavicipitáceos**

Los endófitos no clavicipitáceos fueron clasificados de acuerdo a su grupo funcional en tres clases (clase II, III IV), siendo en su mayoría Ascomicetos y una minoría en Basidiomicetos (Sánchez-Fernández et al., 2013). El grupo de hongos denominado endófitos septados oscuros pertenece en su mayoría al filo Ascomicetos, se reconocen por poseer un grupo funcional basado en la presencia de microesclerosios melanizados inter e intracelular en la raíz, pueden tener conidios o tener estructuras estériles como las hifas (Tamayo, 2017).

- Clase II

Esta clase coloniza los tallos, hojas y rizomas incrementando la biomasa de la planta proporciona mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico, lo protege contra hongos patógenos por la síntesis de metabolitos secundarios (Sánchez-Fernández et al., 2013).

- Clase III

La colonización es limitada por los hongos endófitos de esta clase pero puede colonizar varios tejidos como tallos, hojas, corteza, flores y frutos lo que genera resistencia a enfermedades y finalmente por la producción de metabolitos secundarios modifica la sensibilidad al estrés abiótico (Sánchez-Fernández et al., 2013).

- Clase IV

Coloniza solo las raíces de la planta produciendo metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros e inhibe el crecimiento de patógenos (Sánchez-Fernández et al., 2013).

## **1.5 Micorrizas/Hongos micorrízicos**

El término proviene de los vocablos griegos *mike*: hongo y *rhiza*: raíz o raíz fúngica, fue empleado por primera vez en 1885, son microorganismos presentes en el suelo que establecen simbiosis en un 80 % con plantas terrestres formando arbuscúlos, vesículas o hifas dentro de las células corticales de la orquídea (Barrer, 2009).

### **1.5.1 Micorrizas de orquídeas**

La micorriza orquidíode se caracteriza por la asociación simbiótica entre los miembros del género-forma *Rhizoctonia* y la raíz de las orquídeas, donde el hongo forma una estructura denominada “pelotón” en las células corticales de la raíz resultando un enrollamiento hifal, ocupando el espacio intracelular; la clasificación del género depende del número de células de las hifas jóvenes que pueden ser uni, bi y

multinucleadas, los principales géneros micorrízicos presentes en orquídeas pertenecen al grupo Rhizoctonia que lo conforman *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Thanatephorus* y *Tulasnella*; este grupo pertenece a la división Basidiomycota (Mosquera, Bayman y Otero, 2010).

El género-forma Rhizoctonia reúne a hongos filamentosos heterogéneos que no generan esporas sexuales y tienen pocas características morfológicas, por lo que se necesita usar técnicas moleculares para su correcta identificación; ciertos géneros crecen en materia orgánica en descomposición comportándose como saprobios (González, 2008). En su etapa asexual presentan un micelio blanco en coloneas jóvenes, en un lapso de diez días sus células se ramifican, su coloración se torna amarillo o café claro en colonia de 20 días, además se forman ramilletes de células cortas y anchas de forma oval o triangular denominadas células monilioides consiguiendo formar esclerocios, en cambio en la etapa sexual se observa otras características en los géneros *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Thanatephorus* y *Tulasnella* diferenciándose por los basidiocarpos dónde se producen las basidiósporas (Cando y Cárdenas, 2017).

## **1.5.2 Clasificación de hongos micorrízicos**

### **1.5.2.1 Endomicorrizas**

Son micelios sin tabicación que penetra las células del córtex de la raíz permitiendo generar un contacto más directo, así mismo pueden ingresar en el interior de las células formando vesículas como órganos de reserva por lo que no son específicas, pueden colonizar a diferentes especies por su fácil adaptación al medio ambiente y comprenden los hongos Zigomicetos del orden Glomales (Franco, 2002).

### **1.5.2.2 Ectomicorrizas**

La característica de este tipo de micorriza es que el hongo crece alrededor de la raíz de la planta sin penetrar sus células formando una red denominada manto fúngico, el hongo secreta hormonas que provoca la ramificación de la raíz adoptando un aspecto esponjoso (Guamán y Ochoa, 2011).

## **1.6 Técnicas moleculares para la identificación**

### **1.6.1 Extracción de ADN**

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) es el proceso mediante el cual, el ADN se separa de las proteínas, las membranas y otros materiales celulares presentes en la célula, la mayoría de los procedimientos de extracción de ADN sigue tres pasos: romper la células, separar el ADN de los demás componentes y aislar el ADN (Elkins, 2013).

### **1.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, se amplifica en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión, los elementos requeridos para la reacción son: la enzima, oligonucleótidos o primers, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), ion magnesio ( $Mg^{+}$ ), buffer y  $H_2O$ , la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN-polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células (Tamay-de-Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Los primers utilizados para la amplificación del ADN cloroplástico presente en las plantas es denominado *matK*, mientras que para la amplificación del ADN ribosómico nuclear encontrado en los hongos se empleó los espaciadores transcritos internos (*ITS*).



### **1.6.2.1 Región *matK***

El gen *matK* del cloroplasto codifica para una enzima denominada maturasa que colabora a la conformación y maduración de un ARN de transferencia, está ubicado dentro del intrón *trnK* en el genoma con una longitud máxima de 1500 pb, tiene una alta tasa de sustitución, se conserva en la sistemática de la planta que está involucrada en el empalme de intrones del Grupo II, por estas condiciones es utilizado como marcador molecular en estudios de filogenia entre varias especies (Vu, Le, Nguyen, Tran, & Tran, 2018).

Kar, Goyal y Sen (2015), menciona en su investigación que la combinación de los dos locus *rcbL* y *matK* como código de barras estándar para estudios filogenéticos en plantas permite obtener resultados favorables en niveles de discriminación de especies basados en la calidad de secuencias.

### **1.6.2.2 Región *ITS***

La región espaciadora transcrita interna ribosómica nuclear (*ITS*) es el marcador molecular universal para hongos por su facilidad de amplificación y alto contenido de información, corresponde a las secuencias que intercalan secuencias codificantes para la región ribosomal 16 S, 5.8 S y 26 S, cuya extensión varía entre 500 a 750 pb, obteniendo excelentes resultados en la amplificación por poseer una herencia biparental para estudios filogenéticos, se ha confirmado que determinadas secuencias del ADN ribosómico nuclear sirven para clarificar los límites y la identidad de las especies en hongos, siendo regiones candidatas a convertirse en códigos de barras genéticos por su variabilidad y porque son más susceptibles de acumular mutaciones (Fuertes y Mallitasig, 2018).

White, Bruns, Lee y Taylor (1990) citado por Saltos (2012), menciona que en 1990 se diseñó los iniciadores específicos para amplificar, secuenciar fragmentos de ADN mitocondrial y nucleico de hongos denominándolos primer *ITS 1* e *ITS 4*, en la actualidad son útiles para estudios de identidad y de problemas taxonómicos por ser universales para todas las especies fúngicas al obtener un alto número de copias en el proceso de amplificación con resultados confiables.

### **1.6.2.3 Electroforesis**

Es una técnica empleada en la separación de fragmentos de ADN en base a su carga y tamaño, consiste en la migración de partículas o moléculas cargadas en un campo eléctrico, es así que las moléculas con cargas diferentes forman zonas individuales mientras migran para mantener la difusión, esta técnica se lleva a cabo en un medio anticonvectivo con un fluido viscoso y una matriz de gel, por lo tanto, el fraccionamiento de una mezcla de sustancias se logra con alta resolución (Westermeier, 2005).

### **1.6.3 Secuenciación Sanger**

La secuenciación del ADN consiste en determinar la posición de las bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina y citosina) que forman la molécula de ADN, (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, 2015). Este método fue desarrollado por Frederick Sanger y sus colegas en 1977, por ello se denominó Secuenciación Sanger también conocida como dideoxinucleótidos que consiste en sintetizar una hebra de ADN a una hebra simple necesitando ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia de ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos marcados (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), donde estos últimos nucleótidos permiten la adición del nucleótido consecutivo (Garrigues, 2017). Este método consiste en tres pasos:

- **Primer paso:**

Reside en crear “n” fragmentos de ADN de diferentes longitudes, cada uno terminado con un nucleótido marcado, dónde n es el número de bases de nucleótido en la secuencia de ADN (Sigma-Aldrich, 2019).

- **Segundo paso:**

Consiste en separar “n” secuencias de ADN en la electroforesis en un gel capilar, dónde los fragmentos cortos migran más rápido que los fragmentos largos y cuyo resultado son piezas de ADN (Sigma-Aldrich, 2019).

- **Tercer paso:**

Finalmente un láser excita la etiqueta del nucleótido al final de cada secuencia, por lo que la luz emitida por cada nucleótido excitado puede unirse a la base correcta y genera un cromatograma con picos de los nucleótidos en el orden correcto de la secuencia (Sigma-Aldrich, 2019). Con el fin de que la secuencia resultante permita dar a conocer a los investigadores la clase de información genética de un segmento específico de ADN (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, 2015).

## Capítulo 2

### 2. Metodología

#### 2.1 Área de estudio de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan.

Se ubicaron cuatro puntos de recolección distribuidos en los cantones Pedro Moncayo, Mejía y Rumiñahui perteneciente a la Provincia de Pichincha. Ver Tabla 1.

**Tabla 1**

*Puntos de recolección de las muestras de la especie Caucaea pichincae Szlach. & Kolan con sus coordenadas geográficas (UTM)*

Cantón	Lugar de recolección	Coordenadas geográficas	Altitud
Mejía	Aloasí	0°29'48.1"S 78°34'05.7"W	2800
	Paschoa	0°28'24.6"S 78°31'01"W	3100
Pedro Moncayo	Cochasquí	0°04'35.4"N 78°14'39.3"W	2900
Rumiñahui	Rumipamba	0°29'10.5"S 78°26'05.1"W	3000

Elaborado por: Las Autoras, 2019

#### 2.2 Recolección de las muestras del género *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan.

##### con su respectivo hospedero

Las muestras fueron recolectadas en un rango altitudinal de 2800 a 3100 m.s.n.m., cuyas formaciones vegetales de acuerdo a la información del Ministerio del Ambiente del Ecuador (2013), corresponden a Bosque montano pluviales de los Andes del Norte y los Bosques altimontanos norte-andinos siempreverdes. En los puntos seleccionados se recolectaron muestras completas de individuos silvestres de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan, incluyendo un segmento del tallo de su hospedero que contienen a los respectivos hongos endófitos, los cuales fueron almacenados y transportados en cajas de plástico apilables al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Ver Anexo 1.

Posteriormente se extrajo el tejido vegetal de hoja, tejido de raíz de las orquídeas y segmento del tallo de los hospederos para su respectivo análisis, cada muestra fue almacenado en sobres de papel y etiquetados con el código asignado en el libro de campo de Marco Cerna 2017. Ver Tabla 2.

**Tabla 2**

*Listado de las muestras colectadas*

<b>Especie</b>	<b>Código</b>	<b>Lugar de colección</b>
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	3805	<b>Aloasí</b>
<b>Hospedero 3805</b>	3T	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	3806	
<b>Hospedero 3806</b>	4T	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	3807	
<b>Hospedero 3807</b>	5T	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	3994	<b>Cochasquí</b>
<b>Hospedero 3994</b>	3994-T	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	3995	
<b>Hospedero 3995</b>	3995-T	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	4087	<b>Pasochoa</b>
<b>Hospedero 4087</b>	4088	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	4091	
<b>Hospedero 4091</b>	4092	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	4095	
<b>Hospedero 4095</b>	4096	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	4106	<b>Cuenca Alta del Río Pita</b>
<b>Hospedero 4107</b>	4107	
<i>Caucaea pichincha</i> Szlach. & Kolan	4110	
<b>Hospedero 4110</b>	4111	

Elaborado por: Las Autoras, 2019

### **2.3 Aislamiento de hongos provenientes de tallos y raíz**

Todo el procedimiento de aislamiento de hongos se realizó dentro de la cámara de flujo laminar *Forma Scientific* logrando de esta manera un ambiente aséptico. El proceso inicia con la preparación del medio de cultivo.

#### **2.3.1 Preparación del medio de cultivo PDA**

El medio de cultivo empleado fue Potato Dextrosa Agar (PDA) óptimo para el crecimiento de hongos, cuya preparación consistió en añadir 39 g de PDA en 1 litro de agua destilada, se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, técnica descrita por Neogen (2015). Finalmente se colocó 25 mL de medio de cultivo PDA en cada caja Petri las cuales fueron selladas con Parafilm y almacenadas a -4 °C.

#### **2.3.2 Protocolo de desinfección de las muestras**

- **Desinfección de las muestras de tallo**

Las muestras de tallos recolectados fueron cortados en segmentos de 1 a 2 cm, se colocaron en tubos *Falcon*<sup>®</sup> de 50 mL, teniendo cada muestra una solución de penicilina 20 ppm durante 48 horas a una temperatura de 24 °C técnica descrita por Hoyos y Rodríguez (2013). A continuación los tallos fueron desinfectados siguiendo el protocolo para aislamiento de hongos endófitos detallada por Deng y colaboradores (2011), en el cual las muestras fueron lavadas en etanol al 95 % durante 1 minuto, sumergidas en hipoclorito de sodio 4 % durante 3 minutos, etanol al 95 % durante 30 segundos y finalmente las muestras fueron lavadas en agua destilada estéril tres veces Ver Anexo 2.

- **Desinfección de las muestras de raíz**

Las muestras de raíz fueron cortadas en segmentos de 1 cm, se las colocó en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL con una solución de penicilina, técnica descrita por Hoyos y Rodríguez (2013). A continuación las raíces fueron desinfectados siguiendo el protocolo descrito por Otero, Ackerman y Bayman (2002), en el cual las muestras fueron lavadas con agua destilada estéril por 2 minutos, alcohol al 70 % por 2 minutos, agua destilada estéril por 2 minutos, hipoclorito de sodio al 3 % por 1 minuto y finalmente agua destilada estéril por 2 minutos Ver Anexo 3.

### **2.3.3 Siembra de las muestras y aislamiento de hongos**

Las muestras de raíz desinfectadas se cortaron en segmentos de 5 mm, a su vez las muestras desinfectadas de tallo se cortaron en fragmentos de 10 mm, para cada muestra se dividió longitudinalmente en 4 segmentos, distribuyéndolos en cada caja Petri con medio de cultivo PDA, una vez realizadas las siembras se almacenaron en una incubadora *Memmert* a 26 °C, aproximadamente a los ocho días se visualizó la presencia y desarrollo de micelios, realizando subcultivos de los hongos obtenidos mediante el uso de agujas hipodérmicas estériles para conseguir material fúngico puro y homogéneo, asignando a cada subcultivo de la muestra un código, técnica descrita por Fuertes-Flores, Mallitasig-Quishpe, Cerna-cevallos y Gutiérrez (2018) Ver Anexo 4.

### **2.4 Identificación morfológica de los subcultivos aislados de tallo y raíz**

A partir de la obtención de lo subcultivos puros procedentes de las muestras de tallo y raíz se obtuvo una muestra de los micelios y conidios de cada subcultivo usando una cinta adhesiva, los cuales fueron colocados en un portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol para este procedimiento se utilizó mecheros bunsen, finalmente

se procedió a tomar fotos como evidencia para la identificación microscópica, técnica descrita por Fuertes-Flores y colaboradores (2018).

## **2.5 Identificación molecular**

### **2.5.1 Extracción de ADN del material fúngico**

En la cámara de flujo laminar se tomó aproximadamente 50 mg de material fúngico de las cepas aisladas en tubos *ependorf*, en los cuales se realizó la extracción de ADN bajo la adaptación de la técnica descrita por Paredes y Yugsi (2016), que consistió en: añadir 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis, se incubó en el termobloque *AccuBlock*<sup>TM</sup> por 20 minutos a 37 °C, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de fenol cloroformo a 4 °C, se homogenizó por 5 minutos, se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos, se trasladó la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 mL, se añadió 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo a -20 °C, se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se transfirió un nuevo tubo de 1.5 mL, se añadió 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol a 4°C, se almacenó las muestras a -20 °C por 15 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante, se colocó 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % a -20 °C, se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante obteniendo un pellet, se secó la muestra en un termobloque *Labnet* durante 35 minutos a 37 °C, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-EDTA) y almacenó a -20 °C. Se comprobó la presencia o ausencia de ADN mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con 5  $\mu\text{L}$  de *SYBR*<sup>®</sup> *Safe DNA Gel Stain* por cada 50 mL de TBE 1X (TBE 10X: Tris base 54 g, ácido bórico 27.5 g y 2.93 g de EDTA 0.5 M).

Cada muestra se preparó con 4  $\mu\text{L}$  de ADN, 4  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 2X Blue Juice y se corrió a 90 voltios por 45 minutos en la cámara de electroforesis *Labnet*, técnica descrita por Lee, Costumbrado, Hsu y Kim (2012). El gel se visualizó en un fotodocumentador *Bio-imaging systems* ® Ver Anexo 5.



### 2.5.2 Amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear

Para la identificación de las orquídeas se amplificó el ADN cloroplástico usando los primers *matK* 2.1a. (F) (5'ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3') y *matK* 2.1a. (R) (5'CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'), para los hongos de raíz y tallo se usó los primers *ITS* 1 (F) (5'CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *ITS* 4 (R) (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3').

La técnica PCR se desarrolló en un termociclador *MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler*, se utilizó el Kit *Phire Plant Direct PCR Master Mix* de *Thermo Fisher Scientific*, las muestras fueron preparadas en tubos de PCR 0.2 mL Ver Tabla 3.

**Tabla 3**

*Preparación de la disolución para PCR con el Kit Phire Plant Direct PCR Master Mix*

Reactivo/Concentración	Cantidad para 1 muestra (µL)
Agua libre de ARNasas	9.75
Disolution Buffer	1.25
Primer Forward (10µM)	0.5
Primer Reverse (10µM)	0.5
Phire Plant Direct PCR Master Mix	12
ADN	1uL ADN ( <i>ITS</i> )
	3 punch ( <i>matK</i> )
Volumen total	25

Fuente:(Thermo Fisher Scientific, 2018)

Las condiciones de temperatura para la amplificación del ADN ribosómico nuclear y cloroplástico respectivamente, se detalla en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Condiciones de temperatura para la amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear*

<b>Etapas/Condiciones</b>	<b>Temperatura para <i>matK</i> (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura para <i>ITS</i> (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94	1 minuto	94	1 minuto
Desnaturalización final	94	30 segundos	94	30 segundos
Hibridación	53	40 segundos	56	1 minuto
Extensión inicial	72	40 segundos	72	40 segundos
Extensión final	72	5 minutos	72	5 minutos

Fuente: (Iza, 2018; Montalvo y Vargas, 2019)

Los resultados de PCR fueron evidenciados mediante la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % teñido con el fluoróforo *SYBR® Safe* bajo las condiciones descritas por Thermo Fisher Scientific (2018), dónde cada pocillo del gel se inóculo con 2  $\mu$ L de producto de PCR y para el marcador *Ladder Express DNA* se colocó 2  $\mu$ L, una vez cargadas las muestras en la cámara de electroforesis se programa la cámara a un voltaje de 90 voltios a 40 min. Por último el gel fue revelado en un fotodocumentador de acuerdo a lo descrito por Iza, (2018); Montalvo y Vargas (2019).

### **2.5.3 Secuenciación**

Se diluyó al producto de PCR a una concentración 20 ng/ $\mu$ L con agua libre de ARNasas obteniendo un volumen final de 20  $\mu$ L, dispensado en un tubo *ependorf* de 1.5 mL respectivamente etiquetados, envueltos con Parafilm, finalmente fueron

empaquetados en fundas *ziploc* al vacío, para su purificación y secuenciación mediante la técnica Sanger Automatizada en la empresa *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea).

#### **2.5.4 Análisis de las secuencias**

Se analizó la calidad de las secuencias obtenidas de la amplificación de la región *matK*, e *ITS* mediante el programa FinchTV versión 1.4.0 Ver Anexo 6. Posteriormente se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de GenBank para determinar el grupo taxonómico más cercano, técnica descrita por Iza (2018).

- **Filogenia**

Las secuencias obtenidas de la región *matK* y la región *ITS* fueron alineadas con el programa *Muscle* del programa *Mega 7*, elaborando un árbol filogenético mediante el método Neighbor-joining, con el propósito de determinar la familiaridad entre las especies aisladas, técnica descrita por Fuertes-Flores y colaboradores (2018).

Se eligió como grupo externo para la región *matK* a la especie *Caucaea phalaenopsis* y para la región *ITS* se optó por la especie *Tremella flava* y *Penicillium glabrum*, las secuencia fueron descargadas del banco de datos GenBank, permitiendo compararlas con las secuencias obtenidas para verificar el correcto alineamiento de las secuencias analizadas, de acuerdo a lo descrito por Carrión (2009).

## Capítulo 3

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Recolección de las muestras del género *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan con su respectivo hospedero

Se recolectaron 10 individuos completos y fértiles de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan. en los cuatro puntos seleccionados: Aloasí 3 muestras, Cochasquí 2 muestras, Pasochoa 3 muestras y Rumipamba 2 muestras, además se recolectó 10 muestras de tallo de la especie hospedera *Oreopanax ecuadoriensis* “Pumamaqui”.

Los especímenes fueron identificados en base a su morfología, utilizando como referencia el texto: “STUDIES IN THE GENUS *ONCIDIUM*. I” de Stacy (1975) y, la muestra de Cuamacas y Gudiño 667 (2000) referida en Tropicos (2019) Ver Figura 2.



Los rangos de altitud de recolección de las muestras de este estudio fueron de 2800 a 3100 m.s.n.m., coincidiendo con la altura de colección de 3000 m.s.n.m., registrada en la muestra de herbario de Cuamacas y Gudiño N.º 667 del 2000, imagen almacenada en la base de datos Tropicos (2019). Además, se evidenció que la especie en estudio se encuentra en las ramas del hospedero,

### **3.2. Aislamiento de hongos de tallo y raíz**

Se aislaron 30 subcultivos de hongos endófitos de tallos pertenecientes a la especie hospedera *Oreopanax ecuadoriensis* Seem Ver Tabla 5, y 22 subcultivos de hongos puros obtenidos de las raíces de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan, ver Tabla 6. Se aislaron hasta cuatro especies de hongos endófitos de cada muestra de tallo del hospedero, al igual que de las muestras de raíces, al respecto Salazar (2017), logró identificar hasta diez especies de hongos endófitos en orquídeas epífitas; mientras que para la muestras de raíces de orquídeas Hoyos y Rodríguez (2013), también aislaron una especie de hongo micorrízico para cada uno de los géneros *Oncidium*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Prostechea* y *Epidendrum*, por otra parte, Pecoraro, Huang, Caruso, Perotto, Girlanda, Cai y Liu (2017), en su investigación del género *Cephalanthera* aislaron hasta 9 taxones de hongos presentes en sus raíces.

**Tabla 5***Subcultivos de los hongos endófitos aislados de las muestras de tallo*

Lugar de recolección	Código de hospedero	Subcultivos
Aloasí	3T	3T-1 3T-2
	4T	4T-1 4T-2
	5T	5T-1 5T-2 5T-3 5T-4
Cochasquí	3994T	3994-1 3994-2
	3995T	3995-1 3995-2 3995-3
Pasochoa	4088	4088-1 4088-2 4088-3 4088-4
	4092	4092-1 4092-2 4092-3 4092-7
	4096	4096-1 4096-2 4096-3 4096-4
Cuenca Rio Pita – Rumipamba	4107	4107-1
	4111	4111-1 4111-5 4111-6 4111-9

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Nota: En la muestra codificada con 4107 se aisló un solo hongo, en las muestras codificadas con 3T, 4T y 3994T se evidenciaron dos hongos en cada muestra y para el resto de las muestras presentaron más de 3 hongos aislados.

**Tabla 6***Subcultivos de hongos aislados de las muestras de raíz*

Lugar de recolección	Código de raíz	Subcultivos
Aloasí	3805	3805-A
	3806	3806-C 3806-F
	3807	3807-A 3807-B 3807-C
Cochasquí	3994	3994-B
	3995	3995-B
Pasochoa	4087	4087-A 4087-B 4087-C 4087-D
	4091	4091-A
	4095	4095-A 4095-C 4095-D 4095-F
Cuenca Rio Pita – Rumipamba	4106	4106-C
	4110	4110-A 4110-B 4110-C 4110-D

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Nota: En las muestras codificadas con 3805, 3994, 3995, 4091 y 4106 se aisló un solo hongo, en la muestra codificada con 3806 se evidenciaron 2 hongos en cada muestra y para el resto de las muestras presenta más de 3 hongos aislados.


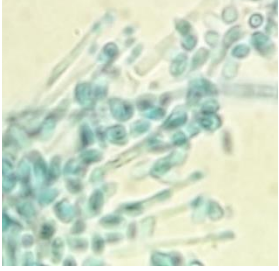
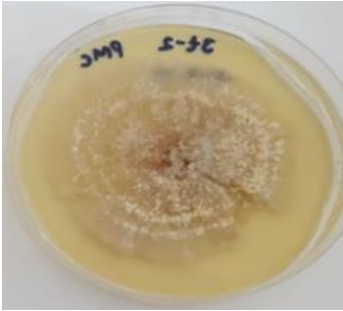
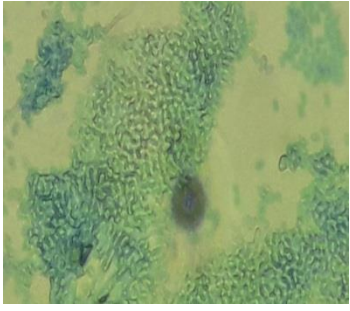

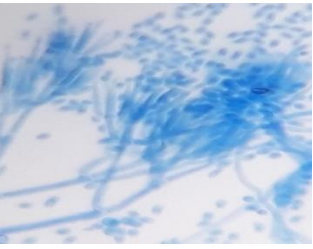
### **3.3. Identificación morfológica de los hongos aislados**


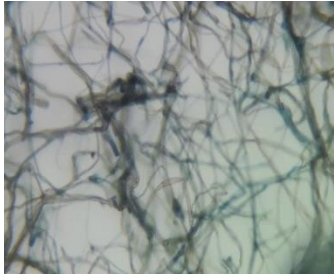

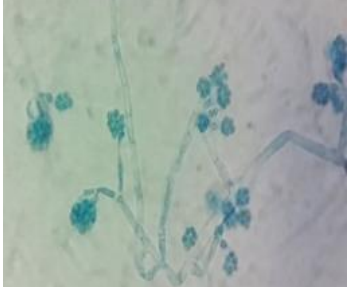


De las diez muestras de la especie *Oreopanax ecuadoriensis* se aislaron 30 subcultivos de hongos endófitos de los cuales se identificaron 25 morfotipos a nivel morfológico y molecular. Ver Tabla 7. A su vez, de los diez individuos de la especie *Caucaea pichincha* se aislaron 22 subcultivos de los cuales se identificaron 18 morfotipos a nivel morfológico y molecular Ver Tabla 8. Mosquera, Bayman y Otero (2010), mencionan que los hongos en cultivos artificiales no pueden esporular, dificultando su identificación por lo cual se los agrupan en morfotipos y la mayoría de los hongos que crecen en medios de cultivo no presentan diferencias morfológicas macroscópicas o microscópicas visibles, por ello, es necesario identificarlos por técnicas moleculares.

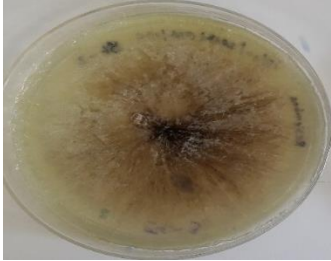
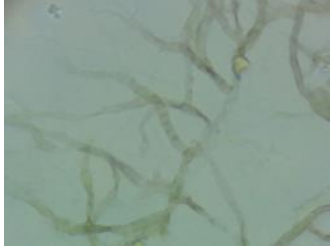


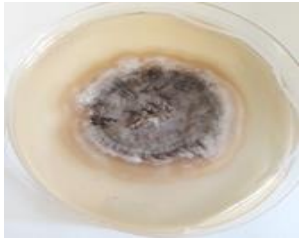
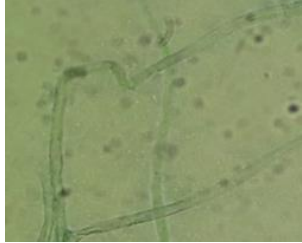


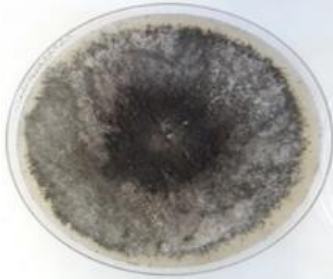
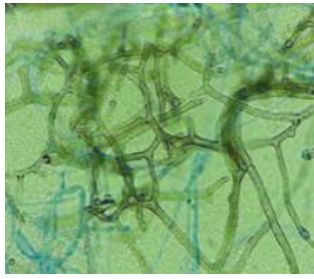



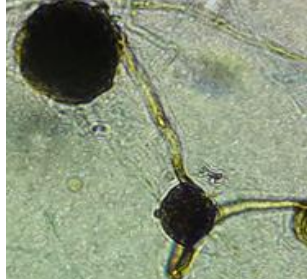
**Tabla 7**


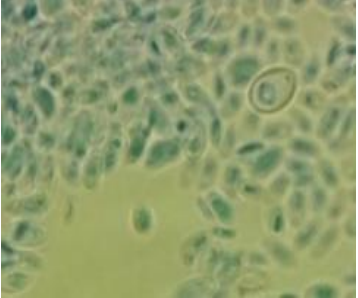
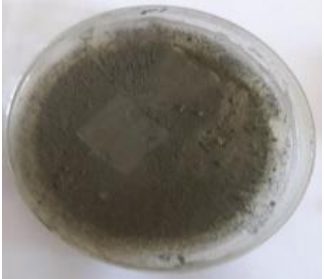


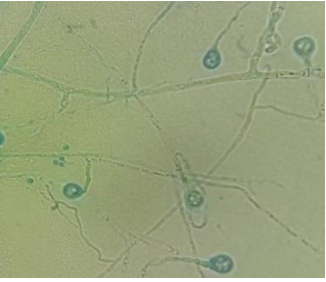
*Estructuras macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de tallos en medio PDA*

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3T-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            ATAAGGGTGGAGAGACCACTCCCAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGGGGATTGCCCC            GGGCCCTCGTGTGCCCGGATCACGGCCCGCCCTAGGAAACTTAACCTTGTATTATTGGAACTCT            TCTGAGTAGTTTTTACAATAATAAAAACCTTCAACAACCGATCTCTGTGGTCTGGCATCGATGAA            GAACCGACGAAATGGGATAAGTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATTCGGAATCTTTGAAG            CACATGGCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCAATTCACCCCTATGCCCTA            GGGCGTGTGTGGGGATCGGCCAAGCCCGGAGGGACGGCCGCCCTAAATCTAGTGGCGGAC            CCGTCTGGCTCTCTCGGAAGTAGTAATATCCGCATCGGACAGCGACGAGCCCTGCCGTTAA            CCCCCA</p>		<p><b>Familia:</b> Bionectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Clonostachys solani</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3T-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            TGGCTTCGGGGCCGGCTGAATATTTTTACCCATGCTTTTGGCGCACTGTGTGTTCTGGGGCGG            TTCGCCCGCCACCAGGACCAAACCAATAAACCTTTTCTTATGCAGTTCATCAGCGTCAGTAAAA            CAATGTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTTGTGGTCTGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAA            ATGGGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATTCAGTGAATTCGGAATCTTTGAAG            TTGGTATCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCAATTTGACCTCAAGCTTTGCTGGTGTGGGG            TTTTGTCTCCCTCTTCTGGGAGACTCGCCCTTAAACGATTGGCAGCGCCCTACTGGTTCGGAGC            GCAGCAGTTTTTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAAGGACGGTACTCCATCAAGACTTTTACAATTTA            ACTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCGGGAGGAG</p>		<p><b>Orden:</b> Pleosporales  <b>Familia:</b> Pleosporaceae  <b>Especie:</b> <i>Bipolaris</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4T-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            GGAGGAGGTCCTCGGGTCCACCTCCACCCCTGTHTAAGGAACCTTGTGCTTCGGGGGCCCGCC            TCACGGCCGGCGGGGATCCCGCCCGGGCCCGCCCGCCCGGAAAGCCACCTGTGAACCGTGTCTG            AAGTATGCAAGTCTGAGACAATTAATAATTAATAAACTTCAACAACGGATCTTGTGGTTCGGC            ATCGATGAAGAAGCAGCGAAAATGGGATAACTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATTCAGTGA            CTTTGAAGCCACATTTGCCCTCTGTGATTCCGGAGGGCATGCTGTCGAGCGTCAATTTGCTCCCTC            CAGCCCGCTGGTGTGTGGCCCGCCCTTCCAGGGGGCGGGCCGAAGGACAGCGGGC            CACCGGCTCGGCTCTGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGGCGGCTCAGC            CGACCCCTCAATCTATTTTTCAAGTTGA</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Trichocomaceae  <b>Especie:</b> <i>Penicillium waksmanii</i></p>


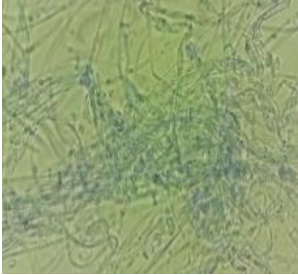

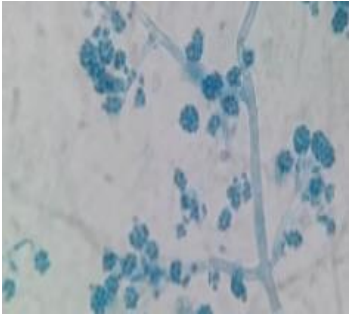

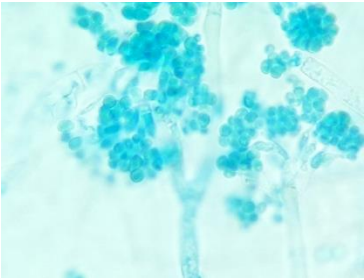
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4T-2		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CGAGTGGGGTGTCCGGGCGCCAACTCCACCCCTTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGG  AGCCCTTCGGGGGCGAGCCGCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTC  TGAATATAAAATCAGTAAAACCTTCAACAATGGATCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAG  CGAACTGCCGATAAGTAATGGAATTGCAAAATTCAGTAAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGGC  CCCCCTGCATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGCGTCAATGCTGCCATCAAGCCCGGCTTGTGTG  TTGGTTCGTCGTCCTCCCGGGGACGGGGCCGAAAGGCAGCGGGGACCCGCTCCGGTCTCGA  GCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTGATTAGGGCCGCGGGGCGCCAGCCAGCTCTCCAACCAATTT  TTTTAGGTTGACCTCGGATCAGTAGGGATA</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
5T-1		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  ACATCGGTAGTTTCGTCGGGGTGCCTCCCAACCAATGTGAACCATACCAAACTGTTGCCTCGGCGG  GGTCACGCCCGGGTGCCTGCAGCCCGGAACAGGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTT  TTCTGTAGTCCCCTCGGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTT  TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT  TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGGGGCGATG  CCTGTCCGAGCGTATTCAACCCCTCGAACCCCTCGGGGGGTGCGGTTGGGGACCTCGGGAGCCC  CTAAGACGGGATCCCGGGCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCCAGTAGTTT  GCACACTCGCACCGGGAGCGGGCGCTCCAGTCCGTAACCAACCACTTCTGAAATGTTGACC  TCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCATAAAGGGGG</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
5T-2		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  ATTATTAATAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  AAATGGGATAACTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTTGCC  CTCTGGTATCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGCTATTGCTGCCCTCAGCCCGGCTGGTGTGTTGG  GCCCGCCCTTCCGGGGGGGCGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCTCGAG  CGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGGGCGGCTCAGCCGACCCCTCAATCTATTTT  TCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGACGGAGGATG  A</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Trichocomaceae  <b>Especie:</b> <i>Penicillium ubiquestum</i></p>


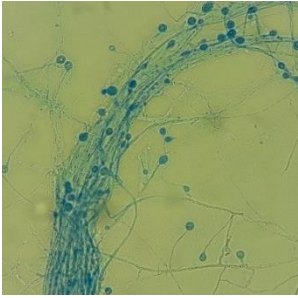

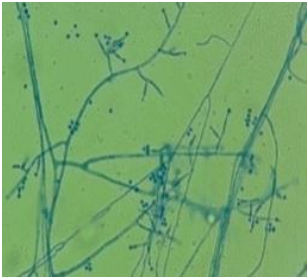

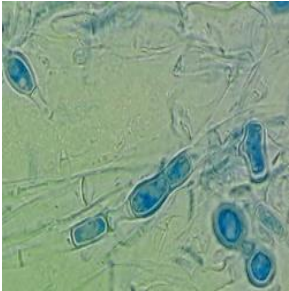
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
5T-3		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  GTAACAAAGGAGTAAATCTCCAACCCGTGGAACATACCTACTGTGCTTCGGCGGGATTGCCCCG  GGCGCTCGTGTGCCCGGATCAAGCGCCGCTAGGAACTAACTTGTGTTTATTTTGGAACTTT  CTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTCAACAACGGATCTTGGTTCGGCATCGATGAAG  AACGAGCGAAATGCCATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGC  ACATTTGGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTCAACCCCTATGCCCTAG  GGCTGGTGTGGGATCGGCCAAAGCCCGGAGGACGCCCGCCCTAAATCTAGTGGCGGACC  CGTCTGGCTCTCTCGGAAGTAGTAATATTCCGCATCGGACAGCGACGAGCCCTGCCCTAAAC  CCCCAATTTCCAAGGTTGAC</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Bionectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Clonostachys solani</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
5T-4		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TCTTGGTTGAGCTGGCTCTCGGAGCAATGTGCAGCCGCCAATTTTATCTTCCACCTGTGCACC  GACTGTAGGTCTGGATACCTCTCGCCCTAGGGCGGATGCGAGGGTTGCTCGTAAGGGCTCCCCTCGA  ACTTCCAGGCTCTACGCTTTTTACACACCCCAATAGTATGATGAGCAATGTAGTCAATGGGCTTCTA  AGCCTATAAAACACTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCGCATCGATGAAGAACGCAG  CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGC  CTCCTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATAATTCACCTCACCGATTTCTGA  ACTGCAGAGGCTTGGATGTTGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTACGGCGGCTGCTCCCTGAAATGC  ATTAGCGAGGTTATGCTGAACTTCCGTCTATTGGTGTGATAATTACTACGCCGTGGACGAGGATC  AGACTCGCTCTAACCGTCCGAGGACAATACCTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTAC  CCGCTGAACTTAAGCATATCTAAACG</p>		<p><i>Agaricaceae</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3994-1		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  GCCCTTCGGGTGCCCGCGTGGCTTACGTAACCTTTTGTATTTTGTGGACTCTGAGAAAAAC  AAGCAATAAGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGGCC  GCCAGTATTCTGGCGGATGCCTGTTGAGCGCTATTCAACCCCTCAAGCCCTGTTGGTGTGGGG  TCCTACGGCTGCCGTAGGCCCTGAAAAGTGTGGCGGGCTCGCTACAACCTCCGAGCGCAGTAATGTA  TCTCGTAGGGAAGTGTGGGGTTCGGCCGTTAAACCCCAATTTTAAACAGGTTGACCTCGGA  TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATA</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Coniochaeta</i> sp.</p>







Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3994-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  GGAGGTGCGCTCCAAGCCCCGGTGGACCGCTAAATTTCTATTTAATACTGTATCTCTGAATGCT  TCAAACGTAATAAGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG  CGCCCATAGTATTCTAGTGGCATGCTATTTCGAGCGTCATTCAACCCTTAAGCCTCAGCTGCT  TAGCGTTGGGAATTCGCCCTGATTTATAGGCGAGTTCCTTAAAGTGATTGGCAGAGTTAGGGCA  TACTCTAACGCTAGTACTATTCTTCGCTTTTGTAGTTGCTGGCGGCTTCCGCTTAAAAACCTT  ATATTTCTCGTGGGTGACCTCGGATTAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGG  CGGAGGA</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Daldinia</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3995-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATTAATCACCCTTGTCTTTGCGTACTTCTGTTCCTTGGTGG  GTTCCGCCACCCTAGGACAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTA  TAATTAACAATTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGA  TAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCTTTGGT  ATTCCAAAGGGCATGCTGTTCGAGCGCTATTGTACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGCGGCT  TGTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCG  CAGCAAGTCGCACTCTATCAGCAAAGGCTAGCATCAATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGA  CCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT</p>		<p><b>Orden:</b> Pleosporales  <b>Familia:</b> Pleosporaceae  <b>Especie:</b> <i>Alternaria alternata</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3995-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TCTTGGTGTAGCTGGCTCTCGGAGCAATGTGCAGCCGCCATTTTATCTTCCACCTGTGCA  CCGACTGTAGGTCTGGATACCTCTCGCCCTAGGGCGGATGCGAGGGTTGCTCGTAAGGGCTCCCC  TCGAACTCCAGGCTCTACGCTTTTTACACACCCCAATAGTATGATGCAGAATGTAGTCAATGG  GCTTCTAAGCCTATAAAAACACTATAACAATTTCAAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATG  AAGAACGCGAGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCCCTTGGCTCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATAAATTCAACC  TCACCAGTTTTCTGAACCTGGACGAGGCTTGGATGTGGGGTTTGTGAGGCTGCCTCACGGCGT  CTGCTCCCTGAAAATGCATTAGCGAGGTTCTATGCTGAACCTCCGCTATTGGTGTGATAAATTAT  ACGCCGTGGACGAGGATCAGACTCGCTTCTAACCGTCCGCGAGGACAATACCTTGACAATTTGAC  CTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCTAAACG</p>		<p><b>Orden:</b> Agaricales  <b>Familia:</b> Psathyrellaceae  <b>Especie:</b> <i>Coprinellus radians</i></p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3995-3		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            CCTTAACGGGGCGCCGACCCCTGCCTCTCCGGAGGTTCCGGGGCGCCCGGAGGTACGAAACT            CTGTATTATAGTGGCATCTCTGAGTATAAAACAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGG            TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGTAATTGCAGAAATCAGTGAATC            ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGTAGTACTCTACCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTT            AACCTCAAGCCCTGCTTGGTTGGGGCCCTACGGCTGCCGTAGGCCCTGAAAGGAAGTGGGGGGC            TCGCTACAACCTCCGAGCGTAGTAATTATTATCTCGTAGGGAGGTTGCGGCGTCTCTGCCGTTA            AAGACCATCTTTAACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCGCGTGAACCTAAGCATA</p>		Especie: <i>Scytalidium</i> sp.
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4088-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            TGGCCCGCTCACGGCCGCGGGGGCTTCTGCCCGGGTCCGCGCGCACCCGGAGACTATTGA            ACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATAAACTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCT            GGTTCGGCATCCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAA            TCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGTCGGAGCGTATT            GCTGCCCTAAGACAGCGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCGCCCGGGGACGGGTCCGAAGGCAGCGGC            GGCACCGAGTCCGGTCTCAGCGGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGAGGCCCGCCGGCCGACG            CCGACAACCAATCATCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGC            AT</p>		<p>Orden: Eurotiales            Familia: Trichocomaceae            Género: <i>Penicillium glabum</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4088-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            CTCGGCGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCGGACCAAGGCGCCCGGAGGACCAACC            AAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCCTCTGTAGG            CGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG            CGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAGAAATCAGTGAATCAGGAATCTTTGAACGCACATTGGG            CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGT            CGGCGTTGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGGCTCGCCGACG            CCTCTCGCCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCC            AACTCTGAAATGGTGACCTCGGATCAGGGAAGAATACCCGCTGAACCTA</p>		<p>Orden: Hypocreales            Familia: Hypocreaceae            Especie: <i>Trichoderma inhamatum</i></p>

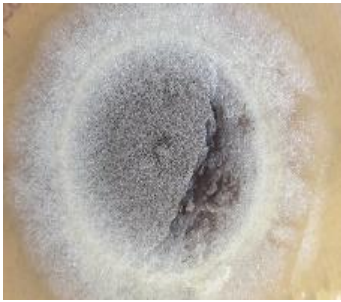


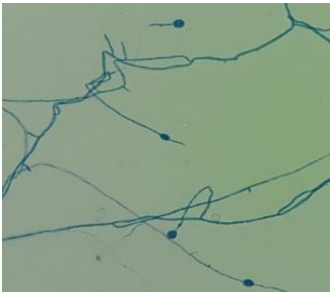

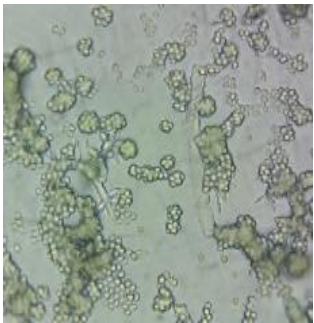


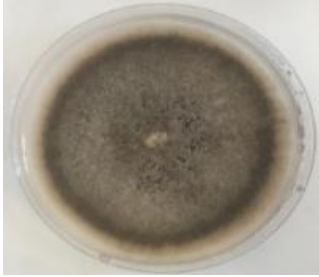
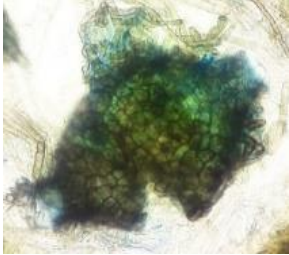

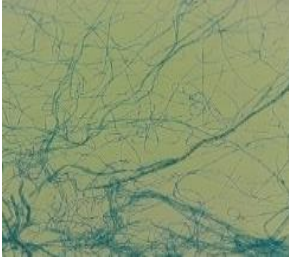
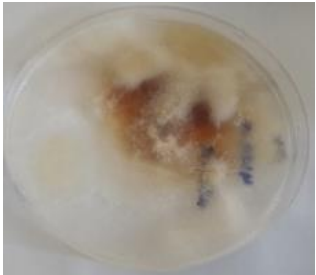

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4088-3		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            GTCTTGGTTGAGCTGGCTCCTCGGAGCAATGTGCACGCCGCCATTTTATCTTTCCACCTGTGCAC            CGACTGTAGGCTGGATACCTCTCGCCCTCACGGGGCGGATGCGAGGGTTGCTCGTAAGGGCTCCC            CTCGAATTTCCAGGCTCTACGTCCTTTTACACACCCCAATAGTATGATGTAGAATGTAGTCAATGGGC            TTCATAGCCTATAAACACTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA            CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACC            TTGCGCTCTTGGTATCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAATTAATCTCAACCTCACCAGTTT            TCTGAACTGTTCTCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTCGGGCGGTCTGCTCCCT            GAAATGCATTAGCGAGGTTATGCT</p>		<p><b>Orden:</b> Agaricales  <b>Familia:</b> Psathyrellaceae  <b>Especie:</b> <i>Coprinellus radians</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4088-4		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            TCGGCGGGATCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCA            AAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC            GTTTCGAAAATGAATCAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC            GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCC            CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGGTC            GGCGTTGGGGATCGGGCTCCCTTAGCGGGGG</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma inhamatum</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4092-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            TCGGCGGGATCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCA            AAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC            GTTTCGAAAATGAATCAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC            GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCC            CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGGTC            GGCGTTGGGGATCGGGCTCCCTTAGCGGGGG</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4092-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            CCCGCCGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCTCGGGACGTTATTTCTACAGCTCTGAG            CAAAAATTC AAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGC            AGCGAAATGCGATAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC            GCCCGCAGTATTCTGGCGGCATGCTGTCCGAGCGTATTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGT            CCGGCTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCC            GCAGCTCTCATGCGCA</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma viride</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4092-3		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            CAGGCGCCGCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCTCGGGACGTTATTTCTACAG            CTCTGAGCAAAAAATTC AAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGA            AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC            GCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTCAACCCTCGAACCC            TCCGGGGTCCGGCGTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGC            GGCTCGCCGAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCGGGAGCGGGCGGTCCACG            TCCGTA AAAACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA            TAT</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma trixae</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4092-7		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4            CAGGCGCCGCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCTCGGGACGTTATTTCTACAG            CTCTGAGCAAAAAATTC AAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGA            AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC            GCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTCCGAGCGTATTCAACCCTCGAACCC            TCCGGGGTCCGGCGTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGC            GGCTCGCCGAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCGGGAGCGGGCGGTCCACG            TCCGTA AAAACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA            TAT</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma olivascens</i></p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4096-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  ACGGCCGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  CAAATAAATTAATACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  CGATAAGTAATGTGAATTGCAAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCGCCA  GTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCAATCAACCCCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTGGGG  ATCGCGAGGGCCCTCGGGGACGGCGCTCCCCAAATACAGTGGCGGTCCGCGCGAGCTTC  CATTGCGTAGTAGTAACACCTCGCACTGGAGAGCGCGCGGCATGCCGTGAACACCCAACCTT  TGAATGGTGACCTCGAATCAGGGAGGAATACCCGCTGAACTTA</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Nectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Fusarium solani</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4096-2		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CCCCTAACTCTGTGCTATGTGTTTTCTGAGTAAAAACAAGCAATAAATAAACTTCAACA  ACGGATCTTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA  ATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTT  GAGCGTATTACAACCCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTGGGATCGCGAGGGCGCCCTGCGGG  CAGCGCCGTCACCAATACAGTGGCGGTCCCGCGCAGCTTCCATTGGCGTAGTAGTAACACCTC  GCATGGAGAAAGCGCGCGGCATGCCGTGAAACACCCAACCTTCTGAATGTTGACCTGAATCAGG  GAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Nectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Fusarium solani</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4096-3		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TTGGGCAGTCGCTGGCTCTCGGAGCAGTGTGACGCCACACCAATTTTATCTATCCACTGTGCA  CCGACTGTAGGCTGGATACTCTCGCCCTTCAATGGCGGATGCGAGGATTGCCCTCTGGGGCTCT  CCTCGAATTTCCAGGCTCTACGCTTTTTACACACCCCAAGTAGTATGATGCAGAATGTAGTCAGTGG  GCTTTACAGCCTATAAAACACTATAACAATTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAG  AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  ACCTTGGCTCCTTGGTATCCGAGGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATAAATCTCAACCTCACCAG  TTTTCTGAACCTGCTGAGGCTTGGATGTGGGGTTTTGTGACGGTGCCTTGGCGGGGTGCTCCCTG  AAATGCATTAGCGGGTCACTAGAACCTCCG</p>		<p><b>Orden:</b> Agaricales  <b>Familia:</b> Psathyrellaceae  <b>Especie:</b> <i>Coprinellus xanthothrix</i></p>



Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4096-4		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CCTAACTCTCTGTTGCTATGTGTGTTTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATAAACTTTCAACAAC  GGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA  TTCAGTGAATCATCGATCTTTGAACGCACATTCGCCGCCAGTATTTCTGGCGGCATGCCTGTTGGA  CGCTATTACAACCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGGAGGCGCCCTGCGGGCAC  GGCCCGTCCCAATAACAGTGGCGGTCCGCCGCGAGTTTCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCA  CTG</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Nectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Fusarium</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4107-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TCGGCGGAGTTATTTTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGAT  CTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  GAATCATCGAATCTTGAACGCACATTCGCCGCCAGTATTTCTGGCGGCATGCCTGTCGAGCGTC  ATTTACTACCTCGAACC</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4111-1		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CCTGGCCATATCAATAAGCGGAGGATCCGCTATGTGTACCTGCGGCATATCTCTATACGGCGAGGA  TCCCTATATGTGCCCGGCATATCTCTACAGCAGATAGATCTATATCCCTCGCGGGTTTTTA  TAATTCAGACTACTCTCTCCGCTCGTGGGCCCTTACGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGG  ATCTCTTGGTCTGGTCATCTATGAAAAACGCACCTAAATGCGATAAGTACCCGTGCCATTGCAGAA  TTCAGTGAATCCTCTATATCTTTGAAACGCACACTTGTACCCGCCCTACTCTGGTCGGTGAATGC  CCTGTCCGAAGCTGTCATTGTCAACCCCTCCTATCCTCTCCAGGGGCGTCCG</p>		<p><b>Orden:</b> Hypocreales  <b>Familia:</b> Hypocreaceae  <b>Especie:</b> <i>Trichoderma harzianum</i></p>

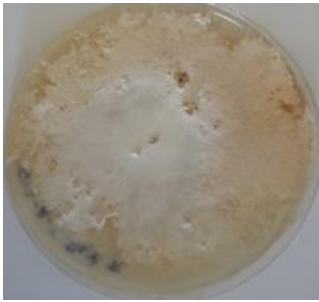
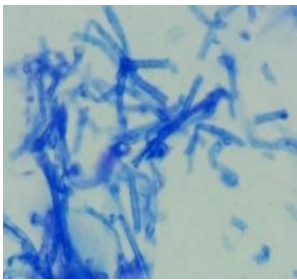

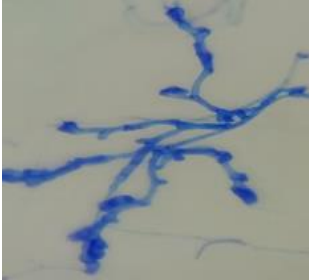


Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4111-5		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TGGCTTCGCGGCCGGCTGAAATATTTTTACCCATGTCTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGG  TTCGCCGCCACCAGGACCAACCATAAACCTTTTTCTATGCAGTTTCCATCAGCGTCAGTAAAA  CAATGTATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTTGGCATCGAAGAAGCAGCGAA  ATGCGATACGTAGTGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCT  TTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTGTACCTTCAAGCTTGTCTGGTGTGGGCG  TTTTGTCTCCCTCTTCTGGGAGACTCGCCTTAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTCGGAGC  GCAGCACATTTTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAAGGACGGTACTCCATCAAGACTTTTACAATTTA  ACTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCGGGAGGAG</p>		<p><b>Orden:</b> Pleosporales  <b>Familia:</b> Pleosporaceae  <b>Especie:</b> <i>Bipolaris</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4111-6		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  AGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAA  GTAGTGTGAATTCCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTC  ATGGGGATGCTGTTGAGCGCTCATTGTACCTCAAGCTTGTCTGGTGTGGGCTTGTCTCGC  CTC</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Colletotrichum</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4111-9		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  GCACACTTAAACATACCCCTTACGAAGTATCTGAATGTACCTTGCCTTAACTCGCACAAATACAACCT  TCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT  TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCCTTGGCATTCGAGGGGCACG  CCTGTTCCGAGTGTGGAATCTCCACCCTTACCTTTTTCGAAGGGTACTGGGCTGGGATTTGGG  AGCTTGGGGTCCCTGGCCGATCCGCTCTCTTGAATACATTAGCGAAGCCCTTGGCCCTTGGTGTG  ATAGTCATCTACGCC</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Peniophora</i> sp.</p>


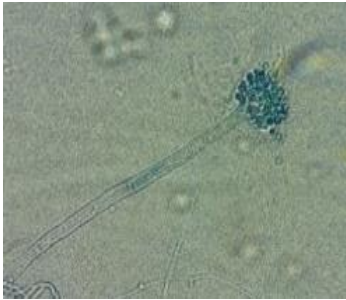



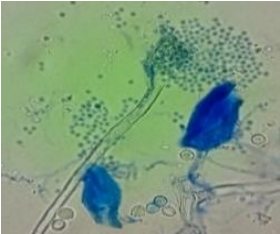
Nota: Las muestras fueron observadas con microscopio "Nikon Elipse E100" a 100x con aceite de inmersión. La secuencia molecular se presenta en la misma tabla. La identificación se encuentra en el anexo 8.

Elaborado por: Las Autoras, 2019

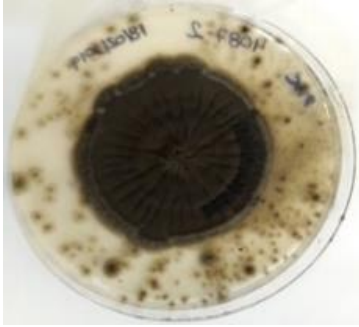
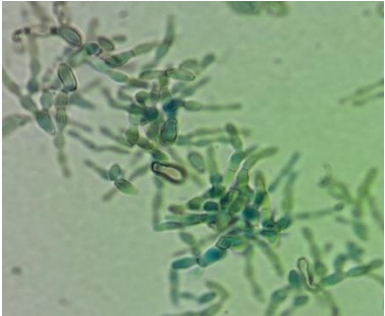
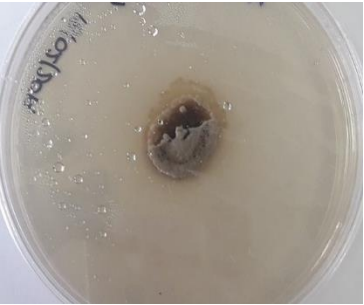


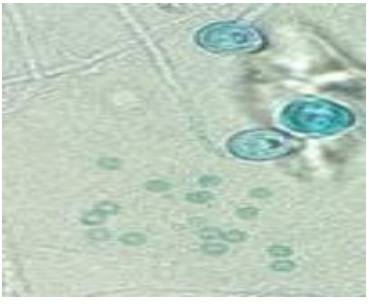
Fuente: (Arias y Piñeros, 2008; Barnett, 1967; Hoyos y Rodríguez, 2013).


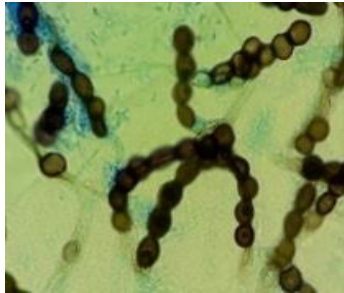

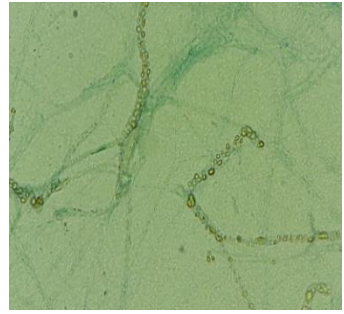

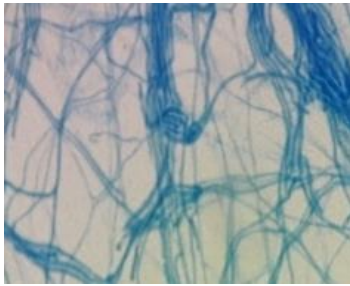




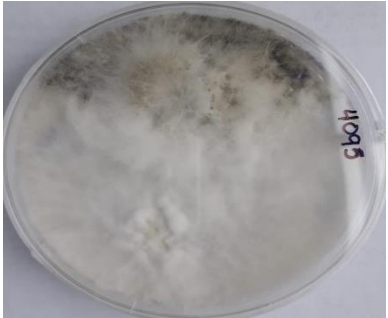

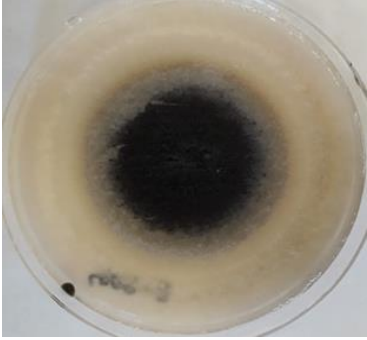
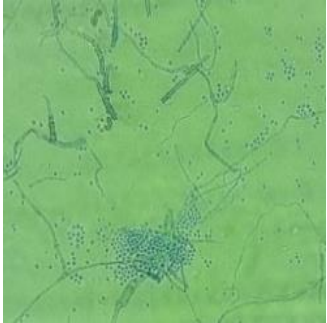
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3807-A		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  TCGGGGTGGCGACCACTTCCCAACCCATGTGAACCTACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCC  CGGGCCCTCCGGTGGCCCGGATCAGGGCCCGCCCTAGGAACCTTAACTCTGTTTTATTTGAA  TCTTCTGAGTAGTTTTTACAAAATAATAAAAACCTTCAACACGGATCTCTGGTCTGGCATCGA  TGAAGAACGACGCGAAATGGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  GAACGCACATTGGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTATTCAACCCCTA  TGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCAAGGGACGGCCGGCCCTAAATCT  AGTGGCGACCCGTCGTGGCTCTCTCGGAAGTAGTGATATTCGCATCGGAGAGCGTAGGAC  CCTGCGTTAAACCCCAACTTC</p>		<p><b>Orden:</b> Hipocreales  <b>Familia:</b> Bionectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Clonastachys</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3807-B		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CATGTGAACATACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCGCCTCGGCTGCCCGGATCAG  GGCCCGCCTAGGAACCTTAACTCTGTTTTATTTGAATCTCTGAGTAGTTTTTACAAAATAAAT  AAAACTTCAACACGGATCTCTGTTCTGGCATCGATGAAGAACCAGCGAAATGCGATAA  GTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGGCCCGCCAGTAT  TCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTATTCAACCCCTATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGG  TCGGCCAAAGCCGCAAGGGACGGCCGGCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCTCTCT  TGCGAAGTAGTGATATTCGCATCGGAGAGCGATGAGCCCTGCGGTTAAACCCCAACTTCTA  AGGTTGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCAT</p>		<p><b>Orden:</b> Hipocreales  <b>Familia:</b> Bionectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Clonastachys byssicola</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3807-C		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  TACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCGCCTCGGCTGCCCGGATCAGGCGCCCGCCT  AGGAACCTTAACTCTGTTTTATTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAAATAATAAAAACCTTC  AACACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA  TTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC  ATGCTGTCTGAGCGTCAATTCACCCCTATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAG  CCCGCAAGGGACGGCCGGCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCTCTCTGCGAAGTAG  TGATATTCGGATCGGAGAGCGATGAGCCCTGCGGTTAAACCCCAACTTCTAAGGTTGACCT  CAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAG</p>		<p><b>Orden:</b> Hipocreales  <b>Familia:</b> Bionectriaceae  <b>Especie:</b> <i>Clonastachys byssicola</i></p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3994-B		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  GGGAGGCCCTCGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAG  TATGCAGTCTGAGTTTGATTATCATAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTTGGTCCGGC  ATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTAATCATCGA  GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG  CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTGGGCCCCCTGCCCGGTTCTCCCGGGGACGGGCCGAAAAGG  CAGCGCGGCACCGCTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTGAGGCCCGC  CGCGCCAGCCACACCCCAACTTTATTTTCTAAGGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC  TGAACCTTAAGCATATC</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Aspergillaceae  <b>Especie:</b> <i>Aspergillus</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
3995-B		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CCTCCACCCGTGCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGTTTTCGAACGGCCCGCCGG  GAGGCCCTCGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTA  TGACAGTCTGAGTTTGATTATCATAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTTGGTCCGGCAT  CGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTAATCATCGAGT  CTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC  CTCAAGCACGGCTTGTGTGTGGGCCCCCTGCCCGGTTCTCCCGGGGACGGGCCGAAAAGGCA  CGCGCGGCACCGCTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTGAGGCCCGCCG  CGCCAGCCGACACCCCAACTTTATTTTCTAAGGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGA  TACCCCGTGAAC</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Trichocomaceae  <b>Especie:</b> <i>Aspergillus hiratsukae</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4087-A		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CTCCCCCGTGTCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGTTTTCGAACGGCCCGCCGGGA  GGCCTCGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGC  AGTCTGAGTTTGATTATCATAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTTTGGTCCGGCATCGA  TGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTAATCATCGAGTCTTT  GAACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA  AGCACGGCTTGTGTGTGGGCCCCCTGCCCGGTTCTCCCGGGGACGGGCCGAAAAGGACGCGG  CGGCACCGCTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTGAGGCCCGCCGCGC  CAGCCGACACCCCAACTTTATTTTCTAAGGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC  TTAAGCATATC</p>		<p><b>Orden:</b> Eurotiales  <b>Familia:</b> Trichocomaceae  <b>Género:</b> <i>Aspergillus</i> sp.</p>


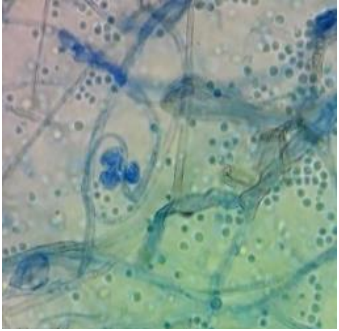



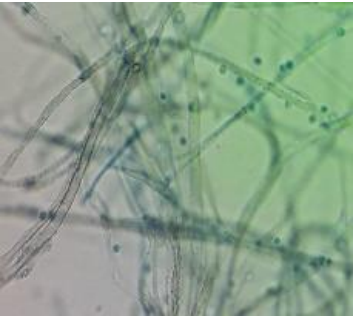



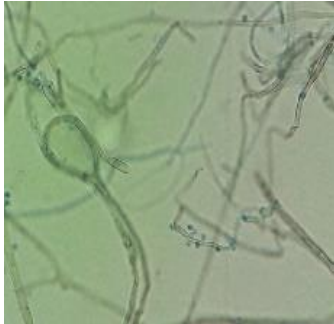
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4087-B		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CGGGGCGACCCCTGCCTTCGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTGCGTFAACTTTGCA  GTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTAACCTTTTAAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATG  AAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCATTTGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCAATTCACCACTCAA  GCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGGGTCGCCGCTCAATGACCGGTGGGTCTCTGT  CCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAGGGGTTCGGGAGGCTACGCCGTAACCAACCC  ATTTCTAAGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC</p>		<p><b>Orden:</b> Capnodiales  <b>Familia:</b> Davidiellaceae  <b>Especie:</b> <i>Cladosporium</i> sp.</p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4087-C		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CGCCACAGCCGCGCCGCCCAATTCAGTAACGTGAAGTTTGTGACCAACCATTAAATGA  AAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTAGGCAACGATGAAGAACCAGCGAAATGCGA  TAAGTAATGCGAATTGCAGAATCAGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGCGCTCTGGT  ATTCGGGAGGACCGCTGTCTATCGCCATTACACACC</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Fusicladium rhodense</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4087-D		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  ACCCATGTGAACCTATCTTTTGTTCCTCGGGCGCAAGTACCCGGACCCAGCGCCCGGGCGGC  CCGCCGGGACAAACCAACTCTTGTATCTTAGTTGATTATCTGAGCGTCTTATTTAATAAGTC  AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT  AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTC  TAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTCACACCCCTAAGCACAGCTTACTGTTGGGACTCTACG  GCCTCCGTAGTTCCCAAAAGCGATTGGCGGAGTGGCAGTAGCCTCTGAGCGTAGTAATCTTTAT  CTCCCTTTTGTAGGTGCTGCCCCCGGCCGTTAAACCCCAATTTTTCTGGTTGACCTCGGAT  CAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATAT</p>		<p><b>Orden:</b> Trichosphaerales  <b>Género:</b> <i>Nigrospora</i>  <b>Especie:</b> <i>Nigrospora</i> sp.</p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4091-A		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CTCCCACCTTGTGTATCTATGTTTGTGTGCTTGGCAGGCGTGGGCTCGCCACCACCGGC  TCTCGGCTGGTGGCGCTGCCAGAGGACTCTTAACTCTGTTTGTAGTGCCTGTGAGTATG  ATAACAATCGTAAAACCTTCAACAGGATCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGA  AATCGATAGTAAATGGAATTCAGAGAATTCAGTGAATCATGGAATCTTTGAACGCACATTGGC  CCCTGGTATCCGAGGGGATGGCTGTTCAGAGCTATTCAACCCCTCAAGCCTTACGTTGGT  TTGGGCTGGCACTGCCTCGCGGCGCGGAGCGCTTAAATCAGTGGCGTGGCCGCTGTG  TTCCAAGGTAGTAATCTTCTCGCTCGGAGACTGGCGGTGCTTGCAGACAACCCATCTTC  TCAAAGTTGACCTCGGATCAGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATA</p>		<p><b>Orden:</b> Agaricomycetes  <b>Género:</b> Rhizoctonia  <b>Especie:</b> <i>Rhizoctonia callae</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4095-A		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTACGCCCCGGGTGCGTAAAAGCCCCGGAAC  AGGGCCCGCCGGAGGAACCAACAACTCTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAG  CTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGAT  GAAGAACCGACGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  GAACGACATGGCCCGCCAGTATTTGGCGGGCATGCTGTCGAGCGTCAATTCACCCCTG  AACCCCTCGGGGGATCGGCTTGGGATCGGACCCCTCACCCGGTGGCCGCTGAAATACA  GTGGCGTCTCGCCGACGCTCTCTCGCGAGTAGTTGACAACTCGCACCCGGAGCGGGCGG  GTCCAGGCTGAAAACACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG  AACTAAGCATACATAAACGGGGGAAGGAATATTTTTCCGCGTGTGCCTCTCTCGTTGC</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Trichoderma hamatum</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4095-C		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  ACCCATGTGAACCTATCTTTTGTGCCTCGGCGCAAGCTACCCGGACCCAGCGCCCCGGCGGC  CCGCGGGGCAAAACCAAACTCTTGTATCTTAGTGTATTATCTGAGCGTCTATTTAATAAGTC  AAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGT  AATGTAATTCAGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGACATTGGCCCATGATATTC  TAGTGGCATGCTGTTCGAGCGTCAATTCACCCCTAAGCACAGCTTACTGTTGGGACTCTAGC  GCCTCGTAGTCCCAAAGGATTTGGGGAGTGGCAGTAGCCTCTGAGCGTAGTAATTTCTTAT  CTCGCTTTGTTAGGTGCTGCCCGCGGCTTAAACCCCAATTTTTCTGGTGTACCTCGGAT  CAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATAI</p>		<p><b>Orden:</b> Trichosphaeriales  <b>Género:</b> Nigrospora  <b>Especie:</b> <i>Nigrospora</i> sp.</p>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4095-D		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CAAACCTGTTATCTTAGTTGATTATCTGAGTGTCTTATTTAATAAGTCAAACCTTCAACAACGG  ATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  TCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTT  GAGCGTCATTTCAACCCCTAAGCATAGCTTACTGTTGGGACTCTACGGCCTCCGTAGTTCGCCAA  AGCCATTGGCGGAGTGGCAGTAGTCTCTGAGCGTAGTAATTTCTTATCTCGCTTTTGTAGGTG  TGCGCGTACCATCTGTGAC</p>		<p><b>Orden:</b> Trichosphaeriales  <b>Género:</b> Nigrospora  <b>Especie:</b> <i>Nigrospora oryzae</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4095- F		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  TGTTATCTTAGTTGATTATCTGAGTGTCTTATTTAATAAGTCAAACCTTCAACAACGGATCTCTT  GGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGT  CATTCAACCCCTAAGCATAGCTTACTGTTGGGACTCTACGGCCTCCGTAGTTCGCCAAAGCCATT  GGCGGAGTGGCAGTAGTCTCTGAGCGTAGTAATTTCTTATCTCGCTTTTGTAGGTGCTGCCCC  CCGGCGTTAAACCCCCCATTTTTCTGGTTGACCTCCGATCAAGGAGGAATACCCCGTGAACCT  AAGCAT</p>		<p><b>Orden:</b> Trichosphaeriales  <b>Género:</b> Nigrospora  <b>Especie:</b> <i>Nigrospora oryzae</i></p>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4106-C		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CATTTCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAAGTAAAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTT  GGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGT  CATTGTACTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCTCTGCGTGTACACTCGGCTTA  AAACAATTGGCAGCCGGCTATTGATTTGGGAGCGCAGTACATCTCGGCTCT</p>		<p><b>Orden:</b> Pleosporales  <b>Familia:</b> Didymellaceae  <b>Especie:</b> <i>Phoma</i> sp.</p>



Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4110-A		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  ATTGTCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTG  GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGCGT  ATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTCA  AAACAATTGGCAGCGCGGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGGCTCTGCACTCACAACG  ACGGCGTCCAAA</p>		<b>Especie:</b> <i>Nothophoma quercina</i>
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4110-B		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  AGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  AAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGT  ATTCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGCTCATTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTT  GTCTCGCCTC</p>		<b>Orden:</b> Pleosporales <b>Familia:</b> Didymellaceae <b>Especie:</b> <i>Didymella</i> sp.
Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4110-C		
<p><b>SECUENCIA:</b> MARCADOR MOLECULAR <i>ITS 1 e ITS 4</i>  CAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCT  GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTG  TACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTCAAAACA  ATTGGCAGCGCGGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGGCTCTGCACTCACAACGACGGC  GTCCAAAAGTACATTTTACACTTGGACCTCGGATCAGGTAAGGATACCGCTGAACCTAAACA  TATCAATAAGCGGAG</p>		<b>Especie:</b> <i>Peyronellaea glomerata</i>

Vista macroscópica / Secuencia		Vista microscópica/ Taxonomía
4110-D		
<p>SECUENCIA: MARCADOR MOLECULAR ITS 1 e ITS 4  CGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAAGTTAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTTGGTTCTG  GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC  GAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGT  ACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGCTCGGCTCTGCGTGTAGACTCGCTCAAAACAA  TTGGCAGCCGGCGTATTGATTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTCTGCACTCACAACGACGGCG  TCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCCTGAACTTAAGCAT  ATCAATAAGCGGA</p>		<p><b>Especie:</b> <i>Peyronellaea glomerata</i></p>

Nota: Las muestras fueron observadas con microscopio "Nikon Elipse E100" a 100x con aceite de inmersión. La secuencia molecular se presenta en la misma tabla. La identificación se encuentra en el anexo 9.

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Fuente: (Barnett, 1967; Fuertes y Mallitasig, 2018; Núñez, 2017).

### 3.4. Identificación molecular

#### 3.4.1. Amplificación del ADN cloroplástico y ribosómico nuclear

- **Región *matK* de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.**

Después de realizar la amplificación de la región *matK* por método directo con la técnica de PCR se comprobó mediante electroforesis la presencia de bandas sobre los 750 pb. para cada fenotipo aislado. Ver Figura 3. Este resultado es similar al obtenido por Albán y Toapanta, (2019) en su trabajo "Identificación molecular del género *Caucaea* (ORCHIDACEAE) mediante el sistema BARCODE y análisis químico de los aromas florales", al igual que los resultados descritos por Montalvo y Vargas, (2019) en su investigación "Revisión de las especies latinoamericanas de orquídeas del género *Dracula* mediante la técnica molecular BARCODE".

### Resultado electroforético de la amplificación de la región *matK*

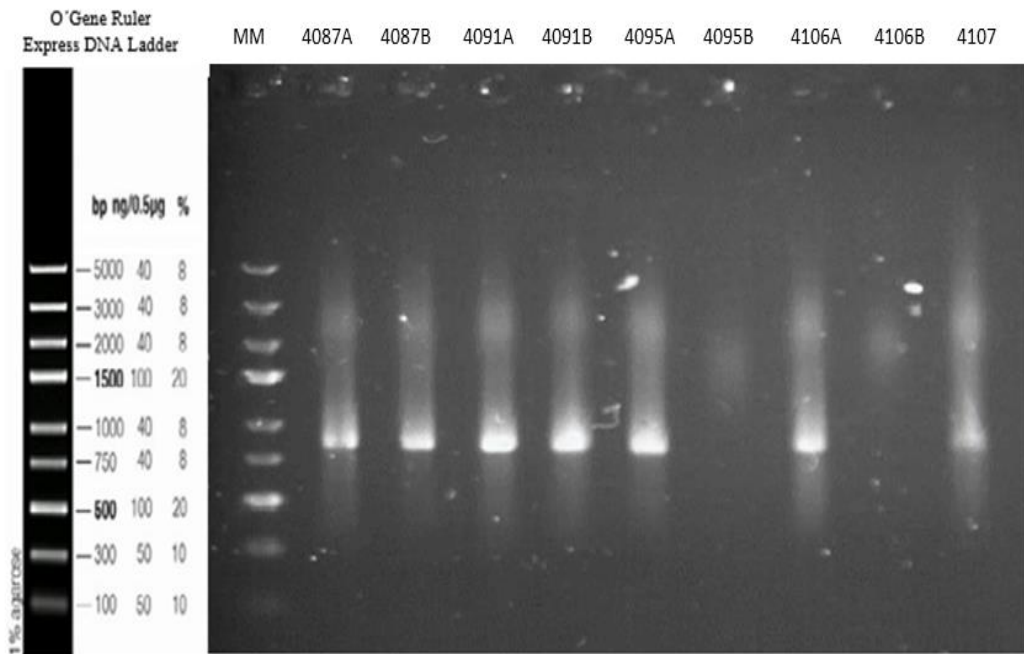


Figura 3 Resultado de la amplificación de la región *matK*, usando como muestra la hoja de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan. recolectada en cada punto geográfico.

Pocillos: MM: Marcador Molecular de 5000 pb. Código de las muestras: 4087A, 4087B, 4091A, 4091B, 4095A, 4095B, 4106A, 4106B, 4107.

Nota: Se visualiza bandas con una media aproximada de 750 pb.

Elaborado por: Las Autoras, 2019

- **Región *ITS* de los hongos aislados**

Se extrajo el ADN de los 52 subcultivos fúngicos aislados para realizar su respectiva amplificación mediante la técnica de PCR, las bandas de los productos de PCR obtenidos presentaron un estimado de 625 pb para cada fenotipo aislado. Ver Figura 4. De acuerdo con el estudio de Fuertes y Mallitasig (2018), la extensión de la región *ITS* varía entre 500 a 750 pb, donde estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio.

### Resultado electroforético de la amplificación de la región ITS

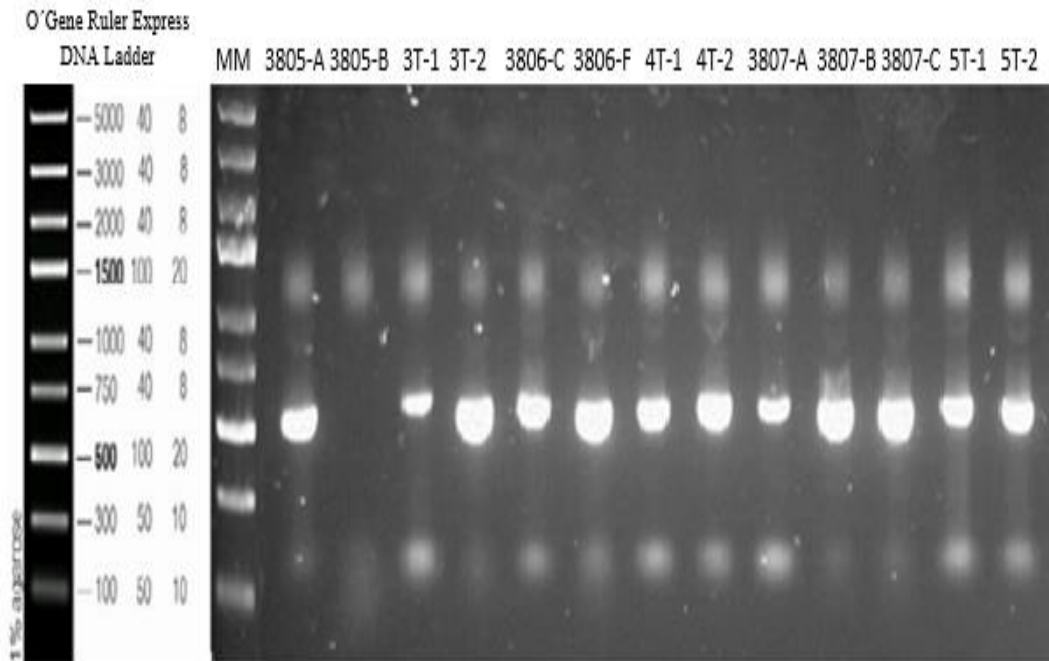


Figura 4 Resultados de los productos de la amplificación de la región ITS.

Pocillos: MM: Marcador Molecular de 5000 pb. Código de las muestras: 3805-A, 3805-B, 3t-1, 3t-2, 3806-C, 3806-F, 4t-1,4t-2, 3708-A, 3807-B, 3807-C, 5t-1 y 5t-2.

Nota: Se visualiza bandas con una media de 625 pb.

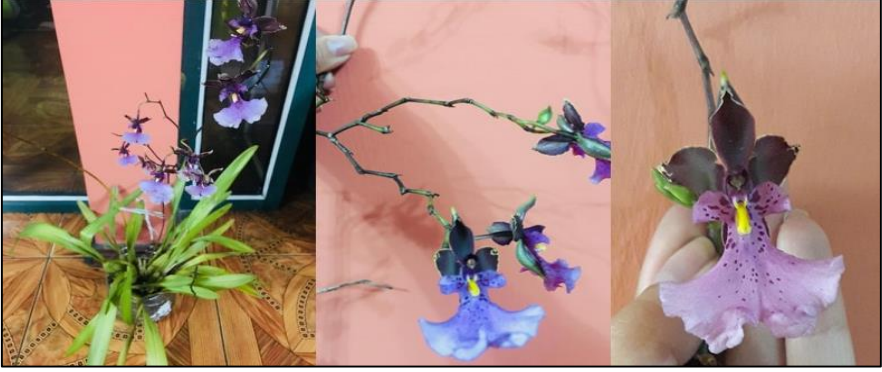
Elaborado por: Las Autoras, 2019

#### 3.4.2 Análisis de las secuencias

Mediante el análisis molecular se determinó que las diez muestras recolectadas de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan son iguales entre sí, lo que indica que las muestras recolectadas corresponden a la especie en estudio. Ver Anexo 7. En la Tabla 9. se detalla una secuencia representativa de las diez muestras recolectadas.

**Tabla 9**

*Secuencia del ADN cloroplástico de la especie Caucaea pichinchae Szlach & Kolan*

<p><b>Fotografía</b></p>			
<p><b>Secuencia</b></p>	<p>Secuencia MARCADOR MOLECULAR <i>matK</i> 2.1a. (F) e <i>matK</i> 2.1a. (R)  ACGAATCTCATAAATTGAATAATCTCATTACTTCAAATAAAATTTATTTACGTCITTTTCAAAAAATAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCCTACATAAATCTTATG  TATATGAATTCGAATATCTATTCTGTTTATTCGTAACAGCTCTTTACGATCAATATCTTGGAGTATTTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAG  AATATCTTATAGTCATGTGTTGTAATCTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAATATACTTTACATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAAGCAATTTTGG  CTTCAAAAGGAACCTTATTCTGATGAAGAAATGGAAATTTCACTGTGAATTTTGGCAATCTTATTTTACITTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATA  AAGCAATTCACCTAACTATCTCTCTTTTCTGGGTATTTTCAAGTGTACTAAAGAAATCCTTTGATAGTAAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTCTAA  TAAACTCTGACTAATAATTAGATACCATAGTCCAGTTATTTATCTTATGGATCATTGTCAAAAAGCTCAATTTTGTACTGTATCGGGTCATCCTATTAG  TAAACCGATCTGGACCGATTATCGGATTCGATATTCTTGATCGATTTTGTGGATATGTAGAAATATTTGTCGGTATCACAGCGGATCTCAAGAAAGC  AGGTTTTGTATCGTATAAAGTATATACTTCGACITTCGTGTGCTAG</p>		
<p><b>Accesión</b></p>	<p><b>Cobertura</b></p>	<p><b>Identidad</b></p>	
<p>gil223371034IFJ565013.1</p>	<p>100 %</p>	<p>100 %</p>	

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Cabe mencionar que la secuencia obtenida se encuentra registrada en GenBank como perteneciente a la especie *Caucaea cucullata*, esto se debe a que *Caucaea pichinchae* Szlach. & Kolan. es una nueva especie que se la confundía con *C. cucullata*, con este estudio se puede hacer el nuevo registro en GenBank. Corroborando esta información con Szlachetko y Kolanowska (2015), dónde indican que la especie en estudio presenta una gran similitud con la especie *Caucaea cucullata*, pero son dos especies distintas.

En la Tabla 10 se presenta la secuencia obtenida de la especie *Oreopanax ecuadoriensis* Seem, luego de comparar con las secuencias de la base de datos GenBank se determinó que no está registrada, por lo cual se puede hacer un nuevo registro.

**Tabla 10**

*Secuencia del ADN cloroplástico de la especie Oreopanax ecuadoriensis Seem*

<b>Fotografía</b>	
<b>Secuencia</b>	<p>Secuencia MARCADOR MOLECULAR <i>matK</i> 2.1a. (F) e <i>matK</i> 2.1a. (R) AGGCACCGGAGAAGGCTTCATGCAGTCTTCTTGTATGTTGTTACAGACATACTTTCTCCACGGATATTGTAATTGGAATACTCCAATAAAGCCGGTTC TTCITTTTCAAAAATAAATCAAGACTATTCTTCTCTATATAATTCATCTATGGAATACGAAATCATCTTCTTCGTAACCAATCTTCTCA TTACGCTCAACATCTTCTGGAACCTTCTTGAACGAATATTTCTATGGAAAAATAAATATCTTGAAAAGTCTTTGTTAAGGCTTTTCAAGTCAATC TATTGTTGTTGAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATTCTCGCTTCAAAAGGGACGCCCTTTTGTGAAAAAATGGACATAT TACTTGTTAATTTATGGCAATGTCATTTTACCTGTGGTCTCAACCGGGA</p>

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Las secuencias obtenidas de los hongos aislados se evidencian en la Tabla 7 y Tabla 8 respectivamente, para su identificación molecular las secuencias fueron analizadas en la base de datos del BLAST arrojando como resultado la identidad de la especie más cercana donde se consideró el porcentaje más alto de cobertura e identidad, en el Anexo 8 se presenta dichos datos para los hongos aislados de las muestras de tallo y en el Anexo 9 para los hongos aislados de las muestras de raíz. Los parámetros considerados en este estudio están correctos para la identificación molecular de acuerdo a lo mencionado por Paredes y Yugsi (2016), dónde indican que los parámetros aceptados para determinar la especie de un microorganismo están entre 97 - 100 % identidad y QC 99 - 100 %.

### 3.3.4.1 Análisis filogenético

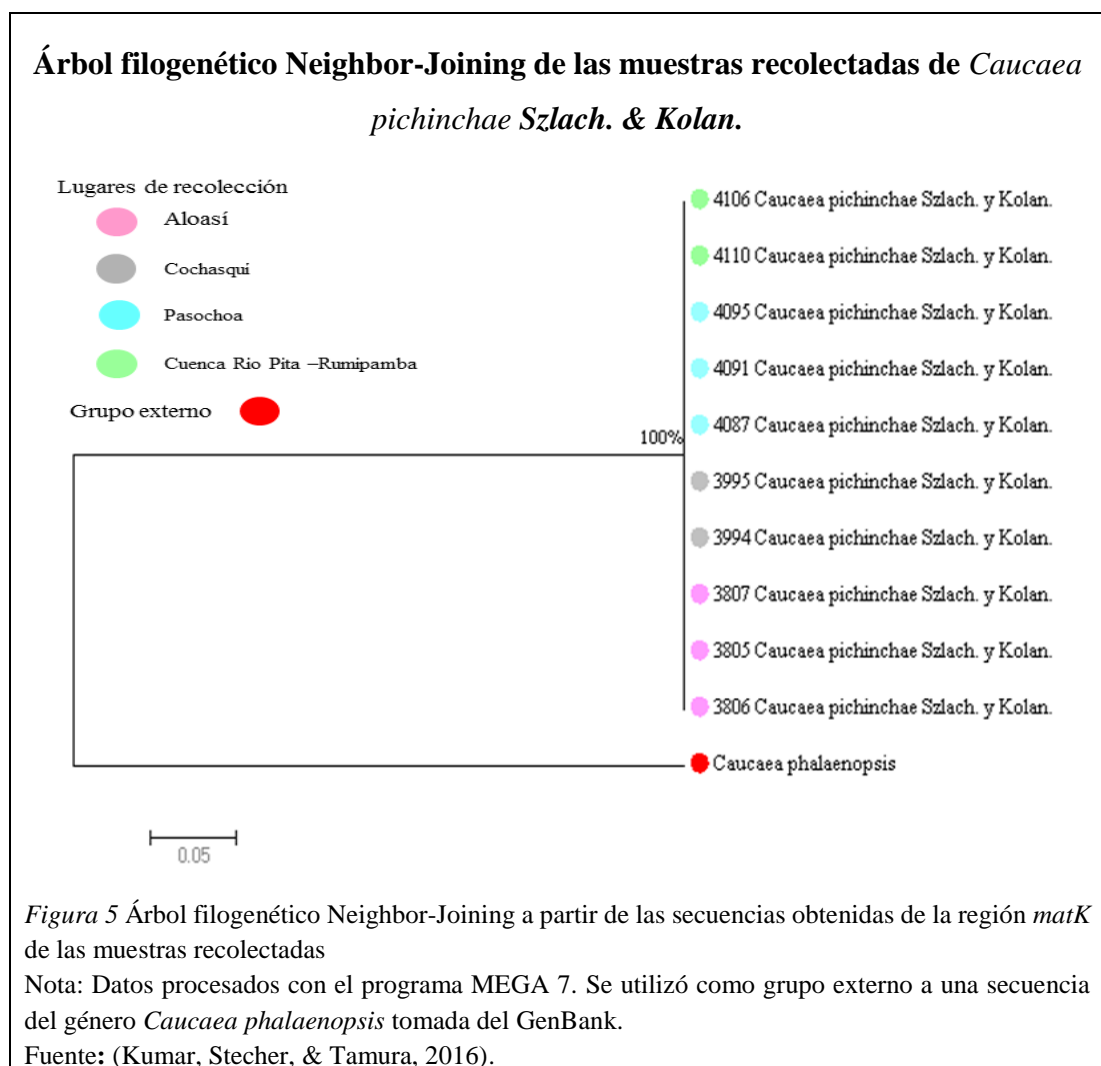
Utilizando las secuencias obtenidas se elaboraron tres árboles filogenéticos bajo el modelo estadístico de Neighbor-Joining, correspondiendo a las muestras de *Caucaea pichincae*, las secuencias de los hongos de las raíces y las secuencias los endófitos de



*Oreopanax ecuadoriensis*, la información de las secuencias fue complementada con datos de los sitios de colección.

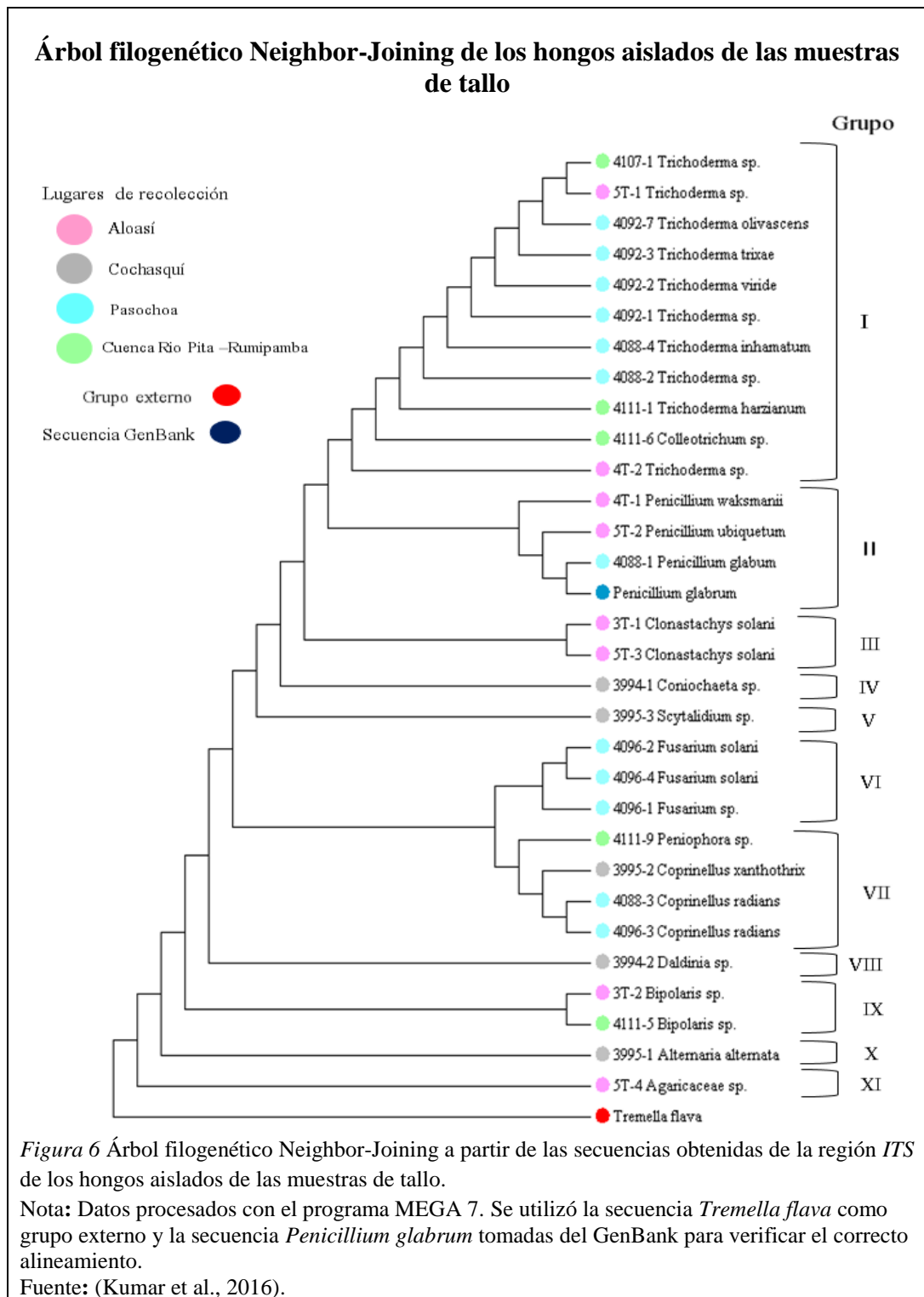
- **Análisis filogenético de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan.**

El árbol filogenético se elaboró con las diez secuencias obtenidas de la especie en estudio y una secuencia de la especie *Caucaea phalaenopsis* tomada del GenBank como grupo externo, después de realizar el análisis filogenético las secuencias se alinearon en base a su género afirmando que la identificación molecular fue correcta, a partir de este análisis se corroboró que todas las especies recolectadas corresponden a la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan. de igual manera, en concordancia con la descripción morfológica descrita en la Figura 1.



- **Análisis filogenético de los hongos aislados de las muestras de tallo**

Para el análisis molecular con respecto a los hongos aislados de las muestras de tallo se elaboró el árbol filogenético con 30 secuencias, se añadió como grupo externo a la secuencia de *Tremella flava* tomada del GenBank Ver Figura 6.





Nuestros resultados se ratifican con lo presentado por Dearnaley, Martos y Selosse (2012), quienes encontraron hongos endófitos de las divisiones Ascomycota y Basidiomycota presentes en relaciones simbióticas de las orquídeas. En la Tabla 11 se indica los integrantes de los nueve grupos formados del árbol filogenético.

**Tabla 11**

*Listado de los grupos formados del árbol filogenético de las muestras de tallo*

N.º grupo	Especie	Lugar de recolección
Grupo I	<i>Trichoderma</i> sp.	Rumipamba – Aloasí
	<i>Trichoderma olivascens</i>	Pasochoa
	<i>Trichoderma trixae</i>	Pasochoa
	<i>Trichoderma viride</i>	Pasochoa
	<i>Trichoderma</i> sp.	Pasochoa
	<i>Trichoderma inhamatum</i>	Pasochoa
	<i>Trichoderma</i> sp.	Pasochoa
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Rumipamba
	<i>Colleotrichum</i> sp.	Rumipamba
	<i>Trichoderma</i> sp.	Aloasí
Grupo II	<i>Penicillium waksmanii</i>	Aloasí
	<i>Penicillium ubiquestum</i>	Aloasí
	<i>Penicillium glabum</i>	Pasochoa
Grupo III	<i>Clonastachys solani</i>	Aloasí
Grupo IV	<i>Coniochaeta</i> sp.	Cochasquí
Grupo V	<i>Scytalidium</i> sp.	Cochasquí
Grupo VI	<i>Fusarium solani</i>	Pasochoa
	<i>Fusarium</i> sp.	Pasochoa
Grupo VII	<i>Peniophora</i>	Rumipamba
	<i>Coprinellus xanthothrix</i>	Pasochoa
	<i>Coprinellus radians</i>	Pasochoa – Cochasquí
Grupo VIII	<i>Daldinia</i> sp.	Cochasquí
Grupo IX	<i>Bipolaris</i> sp.	Rumipamba – Aloasí
Grupo X	<i>Alternaria alternata</i>	Cochasquí
Grupo XI	<i>Agaricaceae</i> sp.	Aloasí

Elaborado por: Las Autoras, 2019

El género *Trichoderma* está presente en tres lugares Aloasí, Pasochoa y Rumipamba, predominando en Pasochoa la mayor cantidad de especies pertenecientes a este género. Durante mucho tiempo se consideró que este género era una micorriza, pero en la actualidad se determinó que es un hongo endófito que habita en la raíces de las orquídeas, usándolo como agente biocontrolador por su eficacia contra patógenos foliares y del suelo (Cobos, 2010).

Se identificó a dos especies de *Penicillium* en Aloasí y la especie *Penicillium glabrum* está Pasochoa, este resultado se corroboró con lo citado por León y Romero (2017) dónde indican que este género es considerado clave en la microbiota del suelo.

Del mismo modo, en Cochasquí y Pasochoa se encuentra el género *Coprinellus*. Por otro lado, Aloasí y Rumipamba comparten la misma especie del género *Bipolaris*.

- **Análisis filogenético de los hongos aislados de las muestras de raíz**

Se elaboró el árbol filogenético con 22 secuencias de los hongos aislados de las muestras de raíz, del mismo modo se añadieron la secuencia descargada del GenBank para verificar el correcto alineamiento de las secuencias Ver Figura 7.

### Árbol filogenético Neighbor-Joining de los hongos aislados de las muestras de raíz

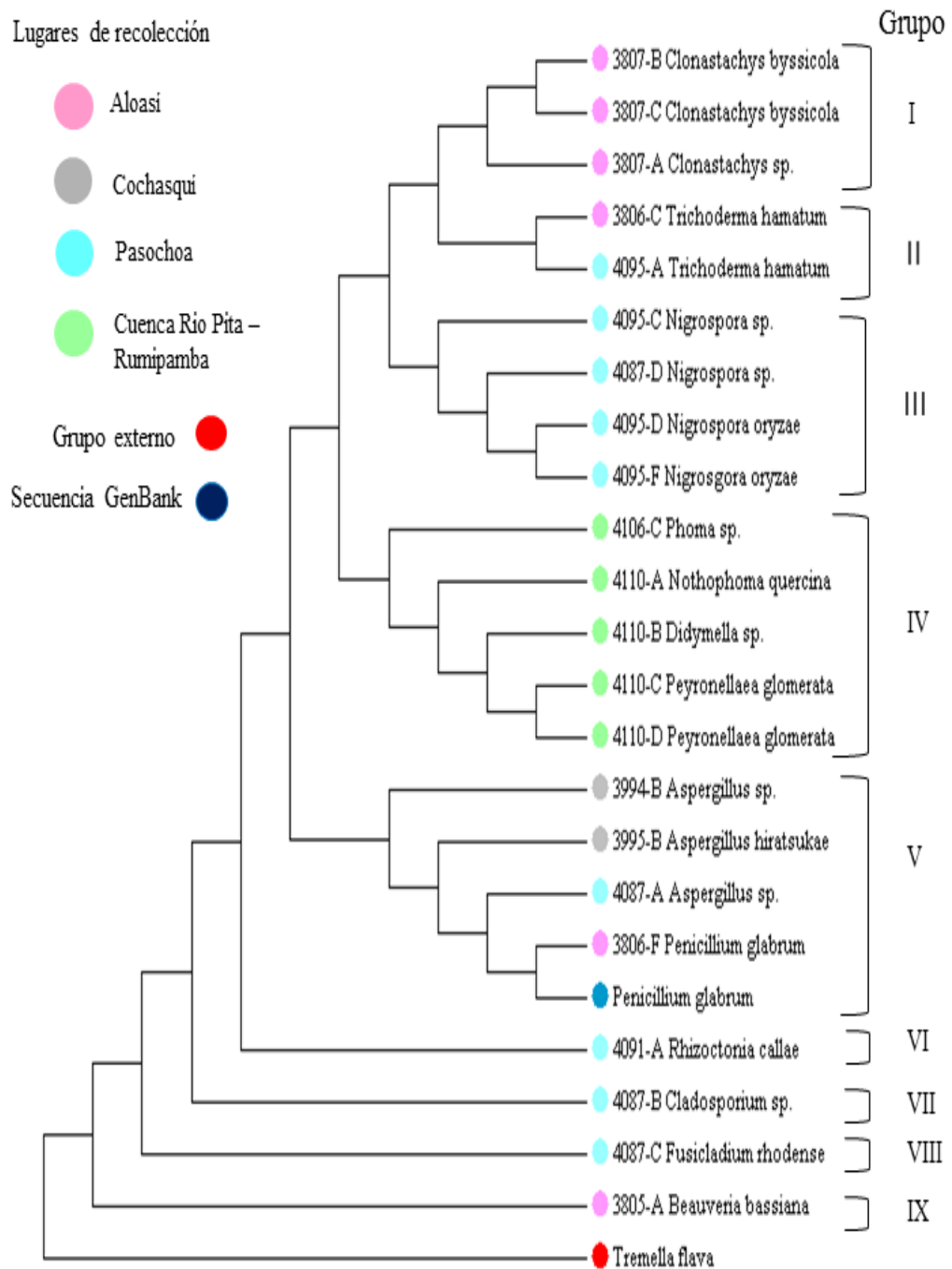


Figura 7 Árbol filogenético Neighbor-Joining a partir de las secuencias obtenidas de la región ITS de los hongos aislados de las muestras de raíz.

Nota: Datos procesados con el programa MEGA 7. Se utilizó la secuencia *Tremella flava* como grupo externo y la secuencia *Penicillium glabrum* tomadas del GenBank para verificar el correcto alineamiento.

Fuente: (Kumar et al., 2016).

Se obtuvieron 18 especies fúngicas para las muestras de raíz, los resultados indican que las especies son específicas para cada lugar, todas las especies identificadas pertenecen a la división Ascomycota. Según Ordoñez (2012), estos géneros pueden ser patógenos para otras plantas pero para las orquídeas son beneficiosas actuando de manera similar a una micorriza es decir, proporcionando nutrientes.

En la Tabla 12 se indica los integrantes de los nueve grupos formados del árbol filogenético.

**Tabla 12**

*Listado de los grupos formados del árbol filogenético de las muestras de raíz*

N.º grupo	Especie	Lugar de recolección
Grupo I	<i>Clonastachys byssicola</i>	Aloasí
	<i>Clonastachys</i> sp.	Aloasí
Grupo II	<i>Trichoderma hamatum</i>	Aloasí – Pasochoa
Grupo III	<i>Nigrospora</i> sp.	Pasochoa
	<i>Nigrospora</i> sp.	Pasochoa
	<i>Nigrospora oryzae</i>	Pasochoa
Grupo IV	<i>Phoma</i> sp.	Rumipamba
	<i>Nothophoma quercina</i>	Rumipamba
	<i>Didymella</i> sp.	Rumipamba
	<i>Peyronellaea glomerata</i>	Rumipamba
Grupo V	<i>Aspergillus</i> sp.	Cochasquí
	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	Cochasquí
	<i>Aspergillus</i> sp.	Pasochoa
	<i>Penicillium glabrum</i>	Aloasí
Grupo VI	<i>Rhizoctonia callae</i>	Pasochoa
Grupo VII	<i>Cladosporium</i> sp.	Pasochoa
Grupo VIII	<i>Fusicladium rhodense</i>	Pasochoa
Grupo IX	<i>Beauveria bassiana</i>	Aloasí

**Elaborado por:** Las Autoras, 2019

Se identificó a la especie *Trichoderma hamatum* en dos lugares diferentes, Aloasí y Pasochoa.

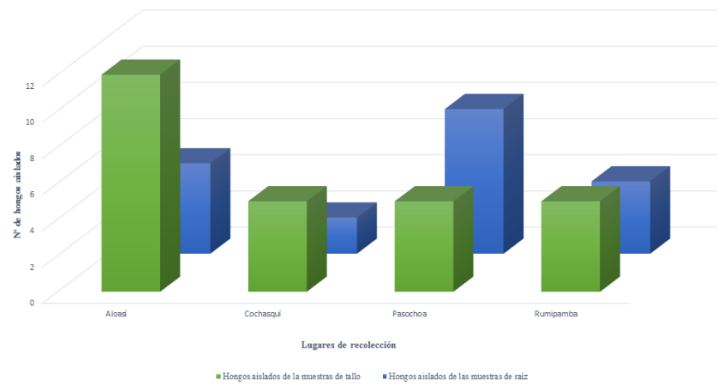
La especie *Penicillium glabrum* se alineó con la secuencia tomada de GenBank comprobando la identificación de la especie al alineamiento, se identificó a dos especies de *Aspergillus* en Cochasquí y una especie de *Aspergillus* en Pasochoa, considerando al género beneficioso ya que proporciona nutrientes a la planta para su desarrollo, esta información se comprueba de acuerdo a lo mencionado por León y Romero (2017), donde son definidos como patógenos descomponedores de materia orgánica o como hospederos en plantas.

Se identificó a la especie *Rhizoctonia callae*, este resultado es similar al estudio realizado por León y Romero (2017), donde mencionan que este género empieza la simbiosis proporcionando nutrientes a la semilla para su desarrollo, manteniendo dicha relación con la plántula.

### **3.4.3 Análisis de la biodiversidad en los puntos de recolección**

En la Figura 8. se indica el número de los hongos aislados para las muestras de tallo y raíz en cada lugar de recolección, determinando que Aloasí presento una mayor cantidad de especies identificadas, por lo contrario, el lugar con menos especies identificadas es Cochasquí, determinando que la localidad de Aloasí presenta mayor biodiversidad. La cantidad de hongos identificados en cada punto de recolección puede ser considerado como un indicador de biodiversidad de acuerdo a lo mencionado por Larrea y colaboradores (2015), donde indican que los indicadores de biodiversidad pueden ser valores numéricos y representarse por medios de gráficos estadísticos que proporcionen información adecuada sobre la evaluación de factores abióticos y bióticos presente en un lugar.

## Número de especies fúngicas identificadas en los lugares de recolección



*Figura 8* Número de especies fúngicas identificadas en los lugares de recolección

NOTA: Aloasí (12 especies fúngicas de las muestras de tallo y 5 especies fúngicas de las muestras de raíz), Cochasquí (5 especies fúngicas de las muestras de tallo y 2 especies fúngicas de las muestras de raíz), Paschocha (5 especies fúngicas de las muestras de tallo y 8 especies fúngicas de las muestras de raíz) y Cuenca Río Pita - Rumipamba (5 especies fúngicas de las muestras de tallo y 4 especies fúngicas de las muestras de raíz).

Elaborado por: Las Autoras, 2019

## Conclusiones

Se obtuvo en los cuatro puntos distribuidos en la provincia de Pichincha un total de diez individuos de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan incluyendo una muestra de tallo de su hospedero, las muestras fueron colectadas en un rango altitudinal de 2800 a 3100 m.s.n.m. se determinó que el árbol hospedero para la especie en estudio es *Oreopanax ecuadoriensis* Seem. el cual fue identificado a nivel morfológico y molecular.

Se aislaron 30 subcultivos fúngicos de las muestras de tallo identificando a 25 especies de hongos presentes en el árbol hospedero *Oreopanax ecuadoriensis* Seem, para las muestras de raíz se aisló 22 subcultivos identificando 18 especies en las muestras colectadas de la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan.

Se desarrolló un estudio filogenético con los hongos identificados de las muestras de tallo, donde se identificó que la especie *Penicillium* está presente en Aloasí y Pasochoa, la especie *Coprinellus* se encuentra en Cochasquí y Pasochoa y Aloasí y Rumipamba comparte la misma especie de *Bipolaris*, mientras que el género *Trichoderma* está presente en Aloasí, Pasochoa y Rumipamba. En lo que se refiere a las muestras de raíz se determinó que el género *Aspergillus* está presente en Cochasquí y Pasochoa, a su vez la especie *Trichoderma hamatum* se encuentra en Aloasí y Pasochoa. En otras palabras, la especie en estudio establece su relación simbiótica con las poblaciones fúngicas existentes en cada sector.

De acuerdo al estudio filogenético se determinó que Aloasí presenta mayor biodiversidad en comparación con las otras localidades de acuerdo a la cantidad de especies identificadas.

## **Recomendaciones**

Buscar otras localidades intermedias de recolección en la provincia de Pichincha para la especie *Caucaea pichincae* Szlach. & Kolan, con el fin de identificar nuevas especies fúngicas.

Elaborar un proceso de aislamiento exhaustivo, ya que es posible que esté presente mayor cantidad de hongos como se evidencia en las otras muestras.

Utilizar como referencia a la cantidad de especies identificadas para cada localidad como indicador de la calidad ambiental de los ecosistemas.



## Bibliografía

- Albán, J., & Toapanta, C. (2019). *Identificación molecular del género Caucaea (ORCHIDACEAE) mediante el sistema BARCODE y análisis químico de los aromas florales*. Tesis. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Arias, & Piñeros. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress challenges, and frontiers. *Fungal. Biol*, 21(2–3), 51–66.
- Barnett. (1967). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Second). West Virginia: Burgess Publishing Company.
- Barrer, S. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Revista Scielo*, 5. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80219-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80219-8)
- Camarena-Gutierrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 18(3), 409–421. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>.
- Cando, M. P., & Cárdenas, M. V. (2017). *Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26368>.
- Carrión, M. del C. (2009). *Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador mediante*

*DNA Barcoding*. Universidad Técnica de Loja. Retrieved from [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador mediante DNA.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación%20de%20Orquídeas%20Epifitas%20del%20Ecuador%20mediante%20DNA.pdf).

Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2015). COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE LA FAMILIA Orchidaceae DEL CANTÓN SANTIAGO DE MÉNDEZ - MORONA SANTIAGO, ECUADOR. *La Granja*, 1(20), 5–19. <https://doi.org/10.17163/lgr.n20.2014.01>.

Chase, M., & Palmer, J. (1988). Variación del ADN del cloroplasto, distribución geográfica y paralelismo morfológico en la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 163–164.

Cobos, G. (2010). *EVALUACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE Trichoderma spp. PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA (Paracercospora fijiensis M.) EN EL CULTIVO DE BANANO (Musa paradisiaca) EN FASE DE LABORATORIO*". Escuela Politécnica del Ejército. Retrieved from [https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2893/1/T-ESPE-IASA II-002325.pdf](https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2893/1/T-ESPE-IASA%20II-002325.pdf).

Crespo, A., & Ortega, M.-B. (2012). Aislamiento De Micorrizas Y Evaluación De La Germinación Simbiótica De Las Semillas De Las Orquídeas En El Orquídeario De La Universidad De Cuenca. *El Escorial*, 34,56.

Dearnaley, J., Martos, F., & Selosse, M. (2012). Orchid Mycorrhizas : Molecular Ecology , Physiology , Evolution and Conservation Aspects, (May 2014). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0>.

Deng, J. X., Paul, N. C., Li, M. J., Seo, E. Y., Sung, G. H., & Yu, S. H. (2011). Molecular Characterization and Morphology of Two Endophytic Peyronellaea

- Species from *Pinus koraiensis* in Korea. *Mycobiology*, 39(4), 266–271.  
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.266>.
- Dodson, C., & Luer, C. (2005). *Orchidaceae. Genera Aa - Cyrtidiorchis*. Botanical Institute, Goteborg University.
- Elkins, K. (2013). DNA Extraction. In *Forensic DNA Biology* (pp. 39–52). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3>.
- Franco, J. de D. (2002). Efectos Beneficiosos de las Micorrizas sobre las plantas. *Bioscripts*. Retrieved from [https://www.ciaorganico.net/documypublic/200\\_infoagronomo.net\\_Micorrizas-beneficios.pdf](https://www.ciaorganico.net/documypublic/200_infoagronomo.net_Micorrizas-beneficios.pdf)
- Fuertes-Flores, B., Mallitasig-Quishpe, D., Cerna-cevallos, M., & Gutiérrez, S. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (orchidaceae). *Bionatura*, 1(1). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.21931/RB/CS/2018.01.01.4>
- Fuertes, B., & Mallitasig, D. (2018). *Identificación morfológica y molecular de hongo micorrízicos de especies del género Dracula y Epidendrum (ORCHIDACEAE)*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15158/1/UPS-QT05355.pdf>
- Garrigues, F. (2017). Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación. Retrieved from <https://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>
- González, M. (2008). Aspectos de sistemática y Biología del complejo *Rhizoctonia*. *Revista Fitosanidad*, 12(3), 147–159. Retrieved from <http://www.actaf.co.cu/revistas/fitosanidad/2008/2008-12-3/Art.3.pdf>

- Granados, D., López, G., Hernández, M., & Sánchez, A. (2004). Ecología de las plantas epífitas. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 101–111. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/629/62913142001.pdf>
- Guamán, M. V., & Ochoa, L. G. (2011). *Aislamiento y selección de hongos potencialmente micorrízicos en seis especies de orquídeas nativas del Cerro Abuga en la Provincia del Cañar*. Universidad de Cuenca. <https://doi.org/10.1360/zd-2013-43-6-1064>
- Henao-Díaz, L., Pacheco-Fernández, N., Argüello-Bernal, S., & Stevenson, P. (2012). Patrones de diversidad de epífitas en bosques de tierras bajas y andinos. *Colombia Forestal*, pp. 161–172.
- Hoyos, L., & Rodríguez, A. (2013). *Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6012/1/UPS-QT04342.pdf>
- Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. (2015). Secuenciación de ADN. Retrieved from <https://www.genome.gov/27563183/secuenciacion-del-adn/>
- Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema BARCODE*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15043/1/UPS-QT10784.pdf>
- Jiang, J. H., Lee, Y. I., Cubeta, M. A., & Chen, L. C. (2015). Characterization and colonization of endomycorrhizal *Rhizoctonia* fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 25(6), 431–445.

<https://doi.org/10.1007/s00572-014-0616-1>

- Kar, P., Goyal, A., & Sen, A. (2015). Maturase K gene in plant DNA barcoding and phylogenetics. *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics*, (April), 79–80. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/274953807>
- Khiralla, A., Spina, R., Yagi, S., Mohamed, L., & Laurin-Mattar, D. (2016). *Endophytic Fungi: Occurrence, Classification, Function and Natural Products*. (Evelyn Hughes, Ed.). Nova Science Publishers. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Sakina\\_Yagi/publication/312198386\\_Endophytic\\_Fungi\\_Occurrence\\_Classification\\_Function\\_and\\_Natural\\_Products/links/593f7015a6fdcc1b10a6d97d/Endophytic-Fungi-Occurrence-Classification-Function-and-Natural-Products.pdf#pag](https://www.researchgate.net/profile/Sakina_Yagi/publication/312198386_Endophytic_Fungi_Occurrence_Classification_Function_and_Natural_Products/links/593f7015a6fdcc1b10a6d97d/Endophytic-Fungi-Occurrence-Classification-Function-and-Natural-Products.pdf#pag)
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Larrea, C., Cuesta, F., López, A., Greene, N., Iturralde, P., Maldonado, G., & Suárez-Duque, D. (2015). *Propuesta de Indicadores Nacionales de Biodiversidad: una contribución para el sistema nacional de monitoreo del patrimonio natural y para la evaluación del impacto de la implementación de la Estrategia Nacional de Biodiversidad y su Plan de Acción 2015-2* (Ministerio). Quito-Ecuador.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (April), 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>
- León, B., & Romero, S. (2017). *Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en seis especies de orquídeas nativas del sector san pedro de Yumate*,

*Molleturo, Azuay, Ecuador.* Universidad de Cuenca. Retrieved from [http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/27226/1/TESIS-BLANCA LEON\\_SANTIAGO ROMERO.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/27226/1/TESIS-BLANCA LEON_SANTIAGO ROMERO.pdf)

Mejía, H., Pino, T., & Pino–Benítez, N. (2008). DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE ORQUÍDEAS DENTRO DE UN BOSQUE HÚMEDO TROPICAL (bh-T) VERTICAL. *Revista Institucional Universidad Tecnológica Del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 27(2), 165–174.

Ministerio de Turismo. (2013). Ecuador, el primer “País de las Orquídeas” del mundo. Retrieved from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del-mundo/>

Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). Sistema de Clasificación de ecosistemas del Ecuador Continental. *Subsecretaría de Patrimonio Natural. Quito.*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Moína-Quimí, E., Oviedo-Anchundia, R., Nieto-Barcelona, S., Herrera-Samaniego, P., & Barcos-Arias, M. (2018). Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador. *Bionatura*, 3(1). <https://doi.org/10.21931/rb/2018.03.01.9>

Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). *Revisión de las especies latinoamericanas de orquídeas del género Dracula mediante la técnica molecular barcode. Tesis.* SUniversidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Mosquera, A., Bayman, P., & Otero, T. (2010). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronomica*, 316–326.

- Neogen. (2015). Agar Papa Dextrosa -Potato Dextrose Agar (7149). *Acumedia*, (7149), 3–5. Retrieved from [https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia\\_pi/7149\\_sp\\_pi.pdf](https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf)
- Neubig, K., Whitten, W., Norris, W., Blanco, M., Endara, L., Burleigh, J., ... Chase, M. (2012). Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 168(2), 117–146. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01194.x>
- Núñez, A. (2017). *Aislamiento e identificación molecular de agentes fúngicos de la frutilla (Fragaria sp.) de Pichincha-Ecuador*. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6463/1/131635.pdf>
- Ordoñez, N. (2012). *Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de Vanilla planifolia Jacks*. Universidad Nacional de Colombia.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversidad y especificidad del hospedador de hongos endófitos de *Rhizoctonia* de orquídeas tropicales. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Paredes, M., & Yugsi, I. (2016). *Identificación molecular de cepas de levadura con capacidad fermentativa y resistente alcohólica aisladas de pitahaya (Stenocereus queretaroensis f.a.c Weber)*. Universidad Politécnica Salesiana, Repositorio Digital. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12145/1/UPS-QT09701.pdf>

- Pecoraro, L., Huang, L., Caruso, T., Perotto, S., Girlanda, M., Cai, L., & Liu, Z. (2017). Fungal diversity and specificity in *Cephalanthera damasonium* and *C. longifolia* (Orchidaceae) mycorrhizas. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jse.12238/full>
- Rodríguez, N. (2009). Orquídeas: Hábitat, tipos de crecimiento, reproducción, hoja y flor. Retrieved November 25, 2018, from <https://naturaleza.paradais-sphynx.com/plantas/orquideas-orchidaceae.htm>
- Roskov, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P. M., ... Penev, L. (2019). Detalles de la especie : *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan. Retrieved from <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/36f95f7cfd24f5df6fa363cc3e23018e/source/tree>
- Ruíz, C., Moreno, J., Salgado, M., & Olivera, A. (2016). Orquídeas Rescate por germinación in vitro. *Universidad Autónoma de Chiapas*, 87.
- Salazar, M. (2017). *Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwarthia grandispora*. Universidad de Guayaquil. Retrieved from [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwo...Saltos, Nancy.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracción%20de%20ADN%20genómico%20y%20amplificación%20de%20la%20región%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos,%20Nancy.pdf)



- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M., & Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencialde metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 162(2), 132–146. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v16n2/v16n2a6.pdf>
- Schaechter, M. (2011). *Eukaryotic Microbes*. (Elsevier, Ed.). Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=DJLIhDnqMk0C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Eukaryotic+Microbes+2011+Schaechter,+M.&ots=quupYkDEJR&sig=0gxaIp1nIcQjeWh2LtzSJiVn-EQ#v=onepage&q=Eukaryotic Microbes 2011 Schaechter%2C M.&f=false>
- Sigma-Aldrich. (2019). Sanger Sequencing Steps & Method. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>
- Stacy, J. (1975). STUDIES IN THE GENUS ONCIDIUM. I. *Botanical Museum Leaflets*, 24(December), 133–167, 169–191. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/41762765>
- Stone, J., Bacon, C., & White, J. (2000). Endophytic microbes. In *Endophytism defined* (pp. 3–30). New York.
- Szlachetko, D., & Kolanowska, M. (2015). Five New Species Of *Caucaea* (Orchidaceae) From Colombia And Ecuador. *Polish Botanical*, 60(2)(January), 127–134. <https://doi.org/10.1515/pbj-2015-0026>
- Tamay-de-Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En*

- Discapacidad*, 2, 70–78. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tamayo, D. (2017). *Papel de hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto Brachiaria decumbens Stapf a condiciones ambientales extremas de sequía y baja fertilidad general del suelo*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/57767/1/1128464359.2017.pdf>.
- Thermo Fisher Scientific. (2018). Phire Plant Direct PCR Master Mix. Retrieved December 4, 2018, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F160L?SID=srch-srp-F160L>
- Torres-Quintero, R. V. (2012). *Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género Teagueia spp.* Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres Quintero Rony Vladimir.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres%20Quintero%20Rony%20Vladimir.pdf)
- Tropicos. (2019). Tropicos.org. Retrieved January 6, 2019, from <https://www.tropicos.org/Name/2201047>
- Tupac, J., & Alomia, J. (2015). *Micorrizas para la conservación de orquídeas Colombianas*. Universidad de los Andes.
- Velasco, P. (2010). Manejo comunitario y propuesta de conservación de orquídeas en Peribuela, Cantón Cotacachi, Provincia de Imbabura. *Universidad Técnica Del Norte*, 1(Tobar 2005), 8–24.
- Vu, T. H. T., Le, T. L., Nguyen, T. K., Tran, D. D., & Tran, H. D. (2018). Review on molecular markers for identification of Orchids. *Vietnam Journal of Science*,

*Technology and Engineering*, 59(2), 62–75.

[https://doi.org/10.31276/vjste.59\(2\).62](https://doi.org/10.31276/vjste.59(2).62)

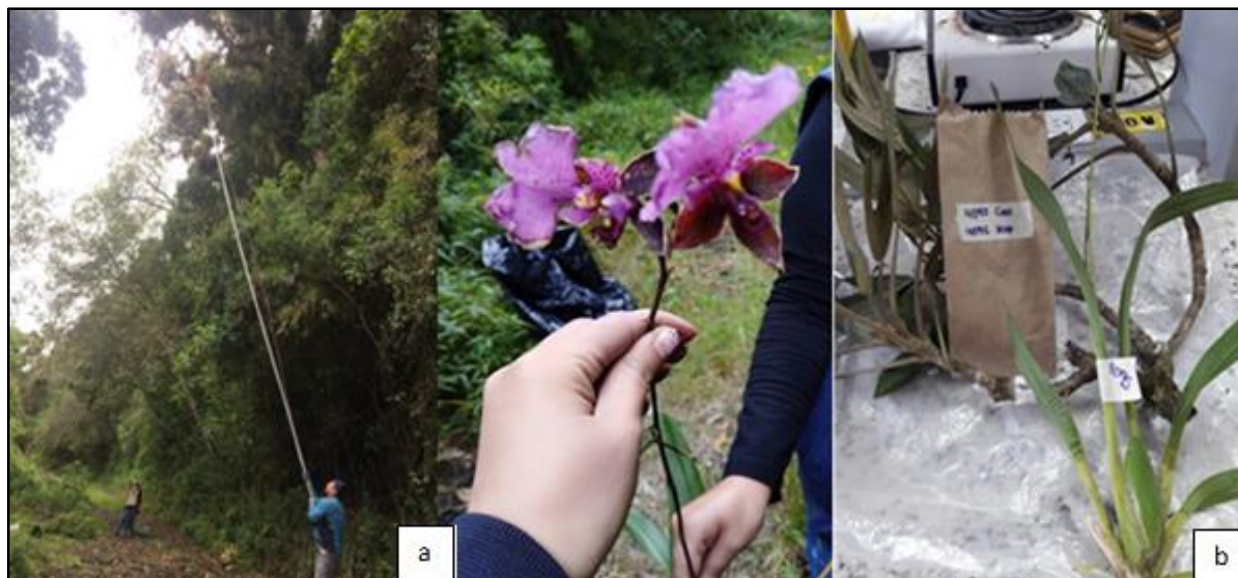
Westermeier, R. (2005). Gel Electrophoresis. In *eLS* (pp. 1–6). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005335>.

White, Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to the Methods and Applications*.

Zhang, G., Liu, K., Li, Z., Lohaus, R., Hsiao, Y., Niu, S., ... Liu, Z. (2017). The *Apostasia* genome and the evolution of orchids. *Nature Publishing Group*, 549(7672), 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature23897>

**Anexos:**

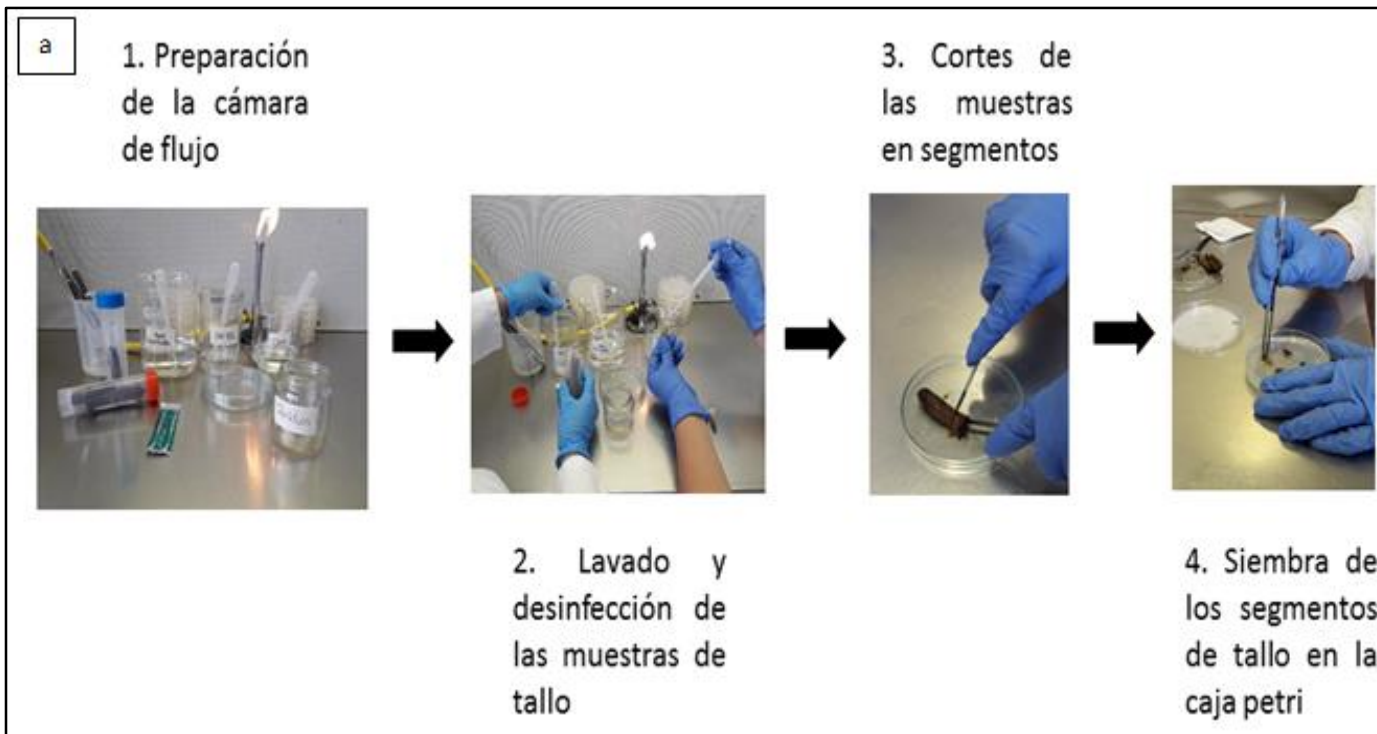
**Anexo 1** Recolección de las muestras de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan., con su respectivo hospedero *Oreopanax ecuadoriensis* Seem. y su etiquetado.



**Nota:** a Recolección de las muestras de la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan, con su respectivo hospedero. b: Etiquetado de cada muestra recolectada.

Elaborado por: Las Autoras, 2019

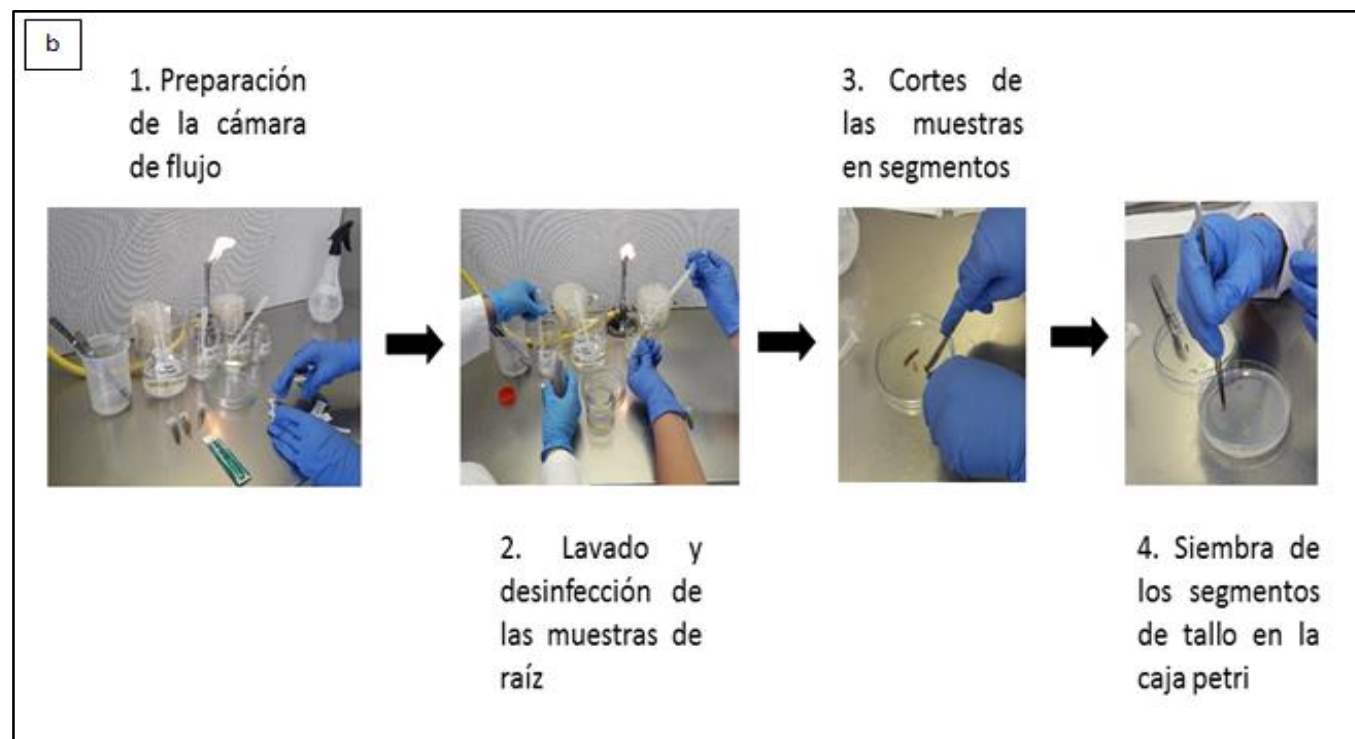
**Anexo 2** Proceso de desinfección de las muestras de tallo.



**Nota:** a Las muestras de tallo fueron desinfectadas y cortados en segmentos de 1 a 2 cm, todo el procedimiento se lo realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

Elaborado por: Las Autoras, 2019

### Anexo 3 Proceso de desinfección de las muestras de raíz.



**Nota:** b Las muestras de raíz fueron desinfectadas y cortadas en segmentos de 1 cm, todo el procedimiento se lo realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

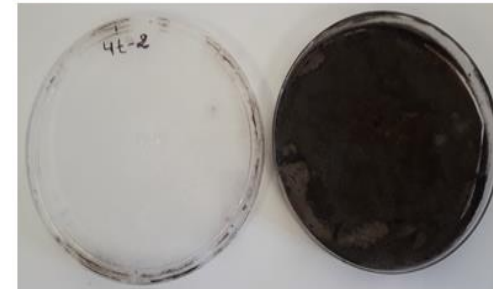
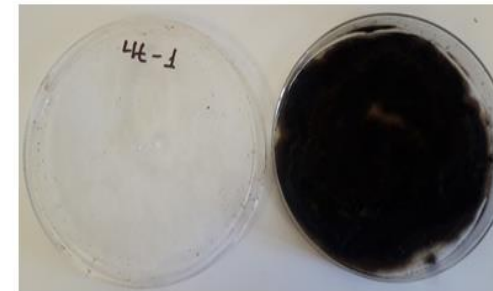
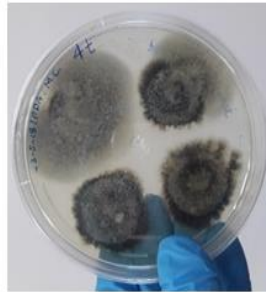
Elaborado por: Las Autoras, 2019

**Anexo 4** Siembra de las muestras y aislamientos de los hongos.

1. Siembra de la muestra en caja Petri con medio de cultivo PDA



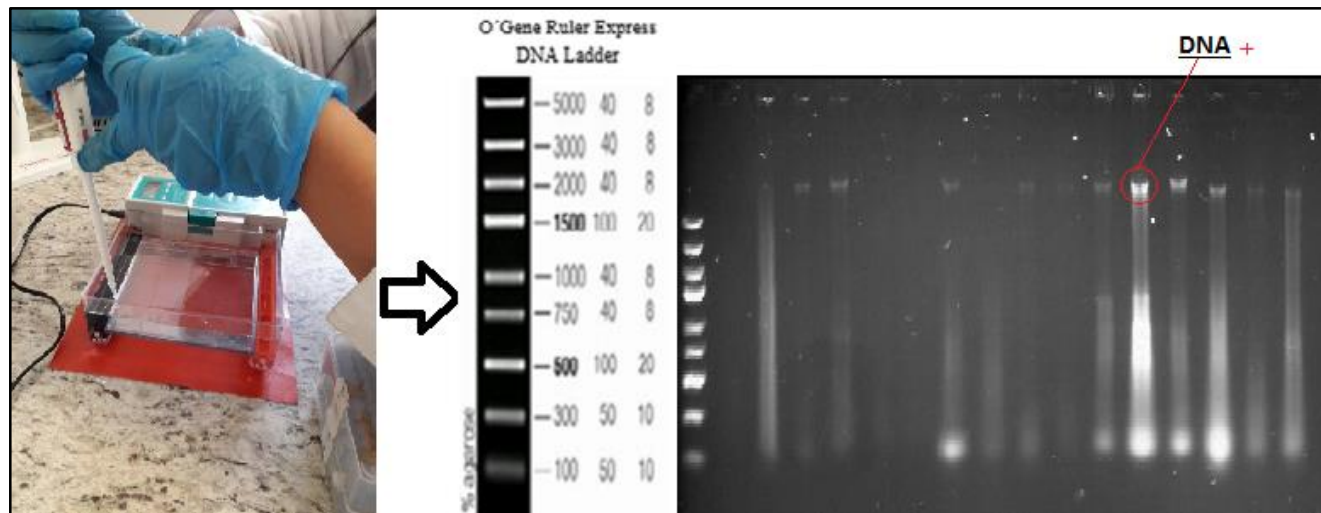
2. Caja Petri incubada por 8 días



3. Subcultivos fúngicos resultantes de la siembra

**Nota:** Las muestras de raíz desinfectadas se cortaron en segmentos de 5 mm, cada muestra se dividió longitudinalmente en 4 segmentos, distribuyéndolos en cada caja Petri con medio de cultivo PDA  
Elaborado por: Las Autoras, 2019

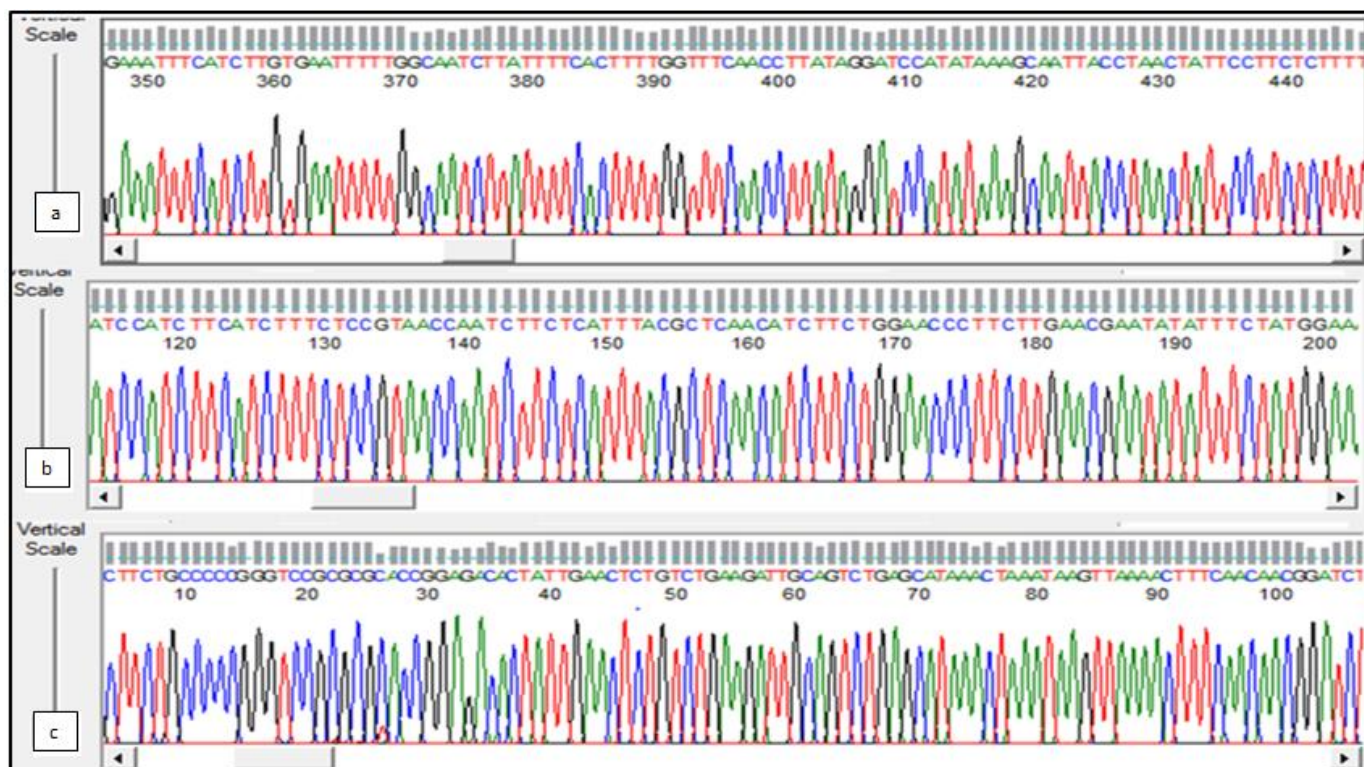
**Anexo 5** Resultado electroforético de la extracción de ADN de los hongos aislados.



Elaborado por: Las Autoras, 2019



**Anexo 6** Electroferograma de las secuencias obtenidas para la región *matK* y la región *ITS*



**Nota:** a: secuencia obtenida de la región *matK* para la especie *Caucaea pichincha* Szlach. & Kolan, presenta una longitud de 810 pb. b: secuencia obtenida de la región *matK* para la especie *Oreopanax ecuadoriensis* Seem. con una longitud de 823pb. y c: secuencia obtenida para la región *ITS* con una longitud de 530 pb.

**Elaborado por:** Las Autoras, 2019



**Anexo 8** Identificación molecular de hongos aislados de tallo utilizando los primers *ITS 1* e *ITS 4*

Código	Identificación	Cobertura	Identidad	Accesión
3T-1	<i>Clonostachys solani</i>	97 %	99.57 %	MH855181.1
3T-2	<i>Bipolaris</i> sp.	99 %	99.63 %	KX867789.1
4T-1	<i>Penicillium waksmanii</i>	98 %	99.59 %	AY373940.1
4T-2	<i>Trichoderma</i> sp.	100 %	99.60 %	MK198883.1
5T-1	<i>Trichoderma</i> sp.	94 %	100.00 %	MG198883.1
5T-2	<i>Penicillium glabrum</i>	99 %	99.75 %	KT192279.1
5T-3	<i>Clonostachys solani</i>	96 %	99.37 %	MH855181.1
5T-4	<i>Agaricaceae</i> sp.	99 %	99.20 %	JQ312164.1
3994-1	<i>Coniochaeta</i> sp.	100 %	100.00 %	MG098277.1
3994-2	<i>Daldinia</i> sp.	98 %	97.61 %	LR585032.1
3995-1	<i>Alternaria alternata</i>	100 %	99.80 %	MN134489.1
3995-2	<i>Coprinellus radians</i>	99 %	98.41 %	AY461815.1
3995-3	<i>Scytalidium</i> sp.	100 %	100.00 %	EU214321.1
4088-1	<i>Penicillium glabrum</i>	100 %	100.00 %	MK910051.1
4088-2	<i>Trichoderma inhamatum</i>	100 %	99.23 %	MH549016.1
4088-3	<i>Coprinellus radians</i>	99 %	98.99 %	KU761146.1
4088-4	<i>Trichoderma inhamatum</i>	100 %	99.73 %	MH549016.1
4092-1	<i>Trichoderma</i> sp.	100 %	100.00 %	MK871236.1
4092-2	<i>Trichoderma viride</i>	100 %	99.72 %	MK290390.1
4092-3	<i>Trichoderma trixae</i>	100 %	99.79 %	MH158556.1
4092-7	<i>Trichoderma olivascens</i>	100 %	100.00 %	DQ677650.1
4096-1	<i>Fusarium solani</i>	100 %	97.76 %	MK209114.1
4096-2	<i>Fusarium solani</i>	100 %	97.91 %	MK209115.1
4096-3	<i>Coprinellus radians</i>	98 %	94.04 %	AY461815.1
4096-4	<i>Fusarium</i> sp.	100 %	97.95 %	JQ086549.1
4107-1	<i>Trichoderma</i> sp.	100 %	98.18 %	MN105468.1
4111-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	71 %	83.15 %	AB856604.1
4111-5	<i>Bipolaris</i> sp.	98 %	99.81 %	MF154608.1
4111-6	<i>Colletotrichum</i> sp.	100 %	100.00 %	MK089264.1
4111-9	<i>Peniophora</i> sp.	100 %	99.72 %	MF136595.1

Elaborado por: Las Autoras, 2019

**Anexo 9** Identificación molecular de hongos aislados de raíz utilizando los primers *ITS 1* e *ITS 4*

<b>Código</b>	<b>Identificación</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>	<b>Accesión</b>
3805 – A	<i>Beauveria bassiana</i>	90 %	100 %	J573517.1
3806 – C	<i>Trichoderma hamatum</i>	92 %	99,81 %	MF408311.1
3806 – F	<i>Penicillium glabrum</i>	96 %	99,81 %	MH864296.1
3807- A	<i>Clonastachys</i> sp	96 %	99.13 %	MK793776.1
3807-B	<i>Clonastachys byssicola</i>	100 %	100.00 %	KC806269.1
3807-C	<i>Clonastachys byssicola</i>	100 %	100.00 %	KC806269.1
3994-B	<i>Aspergillus</i> sp	100 %	99.15 %	MK367491.1
3995-B	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	100 %	100.00 %	MH142469.1
4087-A	<i>Aspergillus</i> sp.	100 %	99.81 %	MK367491.1
4087-B	<i>Cladosporium</i> sp	100 %	100.00 %	MF327373.1
4087-C	<i>Fusicladium rhodense</i>	74 %	97.14 %	EU035440.1
4087-D	<i>Nigrospora</i> sp	100 %	99.39 %	JN207335.1
4091-A	<i>Rhizoctonia callae</i>	91 %	99.78 %	MH268087.1
4095-A	<i>Trichoderma hamatum</i>	94 %	99.27 %	KT314293.1
4095-C	<i>Nigrospora</i> sp.	100 %	99.19 %	MF435144.1
4095-D	<i>Nigrospora oryzae</i>	95 %	100.00 %	MH003486.1
4095- F	<i>Nigrospora oryzae</i>	100 %	99.00 %	MH844777.1
4106-C	<i>Phoma</i> sp.	99 %	99.04 %	MK102705.1
4110-A	<i>Nothophoma quercina</i>	100 %	99.12 %	MN049540.1
4110-B	<i>Didymella</i> sp.	100 %	100.00 %	MK715322.1
4110-C	<i>Peyronellaea glomerata</i>	100 %	99.01 %	MK715322.1
4110-D	<i>Peyronellaea glomerata</i>	99 %	99.01 %	KF512825.1

Elaborado por: Las Autoras, 2019